

18/5/8  
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

009177505  
WPI Acc No: 1992-304940/199237  
XRAM Acc No: C92-135798

Synthetic gene for prepn. of human serum albumin - comprises synthetic  
DNA contg. gene coding the albumin using coding in Escherichia coli  
Patent Assignee: AJINOMOTO KK (AJIN )  
Number of Countries: 001 Number of Patents: 001  
Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 4211375	A	19920803	JP 9114600	A	19910205	199237 B

Priority Applications (No Type Date): JP 9025682 A 19900205

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 4211375	A	37	C12N-015/14	

Abstract (Basic): JP 4211375 A

A synthetic DNA contg. a gene coding human serum albumin (I)  
designed by frequently using codons used frequently in E coli, pref.  
having a specified restriction enzyme map, is new. A plasmid contg. the  
above synthetic DNA, a microbe transformed by the plasmid, and the  
prepn. of (I) in which the microbe is cultured in medium and (I) is  
isolated from the microbe body or the culture, are claimed.

USE/ADVANTAGE - (I) productivity in E coli is enhanced  
Dwg.0/0

Title Terms: SYNTHETIC; GENE; PREPARATION; HUMAN; SERUM; ALBUMIN; COMPRISE;  
SYNTHETIC; DNA; CONTAIN; GENE; CODE; ALBUMIN; CODE; ESCHERICHIA; COLI

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/14

International Patent Class (Additional): C12N-001/21; C12P-021/02;

C12R-001-19; C12R-001-125; C12R-001-08

File Segment: CPI

Best Available Copy

47

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-211375

(43) 公開日 平成4年(1992)8月3日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/14	Z N A			
1/21		7236-4B		
C 1 2 P 21/02		C 8214-4B		
// (C 1 2 N 1/21		8828-4B	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数9(全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-14600

(22) 出願日 平成3年(1991)2月5日

(31) 優先権主張番号 特願平2-25682

(32) 優先日 平2(1990)2月5日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000000066  
味の素株式会社  
東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72) 発明者 橋口 賢一  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号味の  
素株式会社中央研究所内

(72) 発明者 児島 宏之  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号味の  
素株式会社中央研究所内

(72) 発明者 山田 和彦  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号味の  
素株式会社中央研究所内

(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外4名)

(54) 【発明の名称】 合成遺伝子及びそれを用いたヒト血清アルブミンの製造法

(57) 【要約】

【構成】大腸菌で多用されるコドンを用いて設計した、ヒト血清アルブミン蛋白をコードする遺伝子を含む合成DNAを構築する。この合成DNAをプラスミドに組み込み、微生物に導入して該微生物を形質転換する。最後に、この形質転換体を培地中で培養し、その菌体内または培地中からヒト血清アルブミンを単離する。

【効果】大腸菌等においてのヒト血清アルブミン生産量を飛躍的に増加させることができる。

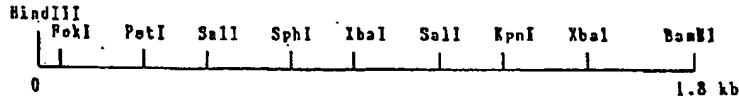
1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 大腸菌で多用されるコドンを用いて設計した、ヒト血清アルブミン蛋白をコードする遺伝子を含む合成DNA。

【請求項2】 合成DNAがヒト血清アルブミン蛋白の\*



【請求項4】 合成DNAが配列表の配列番号1で示される配列を有するものである請求項1記載の合成DNA。

【請求項5】 合成DNAが配列表の配列番号2で示される配列を有するものである請求項1記載の合成DNA。

【請求項6】 請求項1ないし5記載の合成DNAを含有するプラスミド。

【請求項7】 請求項6記載のプラスミドで形質転換された微生物。

【請求項8】 微生物がエシェリシア・コリ (*E. coli*)、バチルス・サチルス (*B. subtilis*) またはバチルス・ブレビス (*B. brevis*) である請求項7記載の微生物。

【請求項9】 請求項7または8記載の微生物を培地中で培養し、その微生物菌体または培地中からヒト血清アルブミンを単離することを特徴とするヒト血清アルブミンの製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はヒト血清アルブミン (HSA) をコードする遺伝子を含む合成DNA、合成DNAを有するプラスミド、該プラスミドにより形質転換された微生物及び該微生物を培養してヒト血清アルブミンを製造する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 組換えDNA技術の進歩によって、大腸菌等の微生物において高等真核生物由来の遺伝子を発現させ、その目的遺伝子産物を微生物を培養することによって取得する技術が発展してきた。一般に高等真核生物の遺伝子は、mRNAを調製して、逆転写酵素によって作製したcDNAからクローニングすることによって得られている。ヒト血清アルブミンについても、例えば特開昭58-56684等にcDNAの調製法が開示されている。

【0003】 蛋白質をコードする遺伝子はその蛋白質のアミノ酸配列を1アミノ酸につきDNAの3塩基からなる遺伝暗号 (コドン) によってコードしているが、あるアミノ酸に対応する遺伝暗号は必ずしも1つではない。そして、大量に発現している遺伝子では生物種によって使用されている遺伝暗号に偏りがみられることが知られ

\* N末端付近をコードする領域に単一の制限酵素切断部位を保持することを特徴とする請求項1記載の合成DNA。

【請求項3】 合成DNAが下記に示す制限酵素地図を有するものである請求項1記載の合成DNA。

10 ている。

【0004】 従って、前記の方法で調製されたcDNAからなる遺伝子は高等真核生物において多用される遺伝暗号からなる遺伝子であり、必ずしも大腸菌等の原核生物である微生物における発現に好適なものではない。

【0005】 また、遺伝子を発現させるには適当な発現制御系に接続する必要があるが、より好適な発現制御系に接続することによって同じ遺伝子の発現効率を飛躍的に高めることが出来ることが知られている。遺伝子をより好適な発現制御系に接続するためには、遺伝子中に存在する制限酵素部位等が適切に配置されていることが操作しやすく、特にコードする蛋白質のN末端付近の領域に単一の制限酵素部位が存在することが望ましい。しかしながら、cDNAにおいては遺伝子中に存在する制限酵素部位は全くランダムと言ってよく、操作上好適な配置をとっている場合は極めて希である。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】 上述の如く、高等真核生物由来の蛋白質を原核生物である微生物を培養することによって工業的に有利に生産するためには、目的遺伝子をより好適な発現制御系に接続することとともに、遺伝子本体もまた宿主たる原核生物である微生物においてより効率よく発現するDNA配列を持ったものであることが望まれる。また、より好適な発現系に接続するにあたっての便宜上、適当な制限酵素部位が、適切に配置されていることが望まれる。本発明の目的は、cDNAを用いて高等真核生物由来の蛋白質を原核生物である微生物に生産せしめる方法の不完全さを是正し、より効率的な遺伝子発現、蛋白質生産を行なうための技術を提供することにある。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、高等真核生物であるヒト由来の蛋白質であるヒト血清アルブミンを大腸菌等の原核生物である微生物においてより効率的に生産するために、ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列をコードするDNA配列を、

- ①アミノ酸配列を変化させない。
- ②操作上有用と思われる制限酵素部位を残し、不都合な制限酵素部位を除く。
- ③目的蛋白質のN末端をコードする領域に単一の有用な制限酵素部位を設ける。

④安定な2次構造を取らないようにする。

⑤大腸菌で多用されている遺伝暗号(コドン)を用いる。

について考慮しながら設計し、化学合成したDNAのオリゴマーから実際にヒト血清アルブミンを大腸菌等の原核生物である微生物において著量生産させ得る合成DNAを構築するとともに、この合成DNAを含有するプラスミドで形質転換された微生物を培地中で培養することにより目的のヒト血清アルブミンを生産することができ、本発明を完成するに至った。

【0008】さて、cDNAを用いて大腸菌(*E. coli*)、枯草菌(*B. subtilis*)等の微生物でヒト血清アルブミンを生成する方法は、特開昭58-56684、特開昭58-150517、特開昭61-275229、特開昭62-215393などに開示されている。しかしこれらは遺伝暗号(コドン)の選択の余地の無いcDNAの持つ性格の故に、その発現効率、従って生産量には自ずと限界があるものである。大腸菌等においてのヒト血清アルブミン生産量の飛躍的な増加は、本発明によって初めて可能となった。また、特開昭62-29985には特定のアミノ酸配列から類推されるDNA配列一般が開示されているが、本発明のアミノ酸配列は特開昭62-29985に開示されているアミノ酸配列とは多くの相違点がある。

【0009】本発明者らは原核生物に適したコドンに注目して、ヒト血清アルブミンをコードするDNAをデザインして化学合成した。

【0010】なお、オリゴヌクレオチドの合成にはトリエステル法(Nuc. Acid. Res. 10, 6553(1982))や、ホスホアミダイト法(Tetrahedron Letters 22, 1859(1981))等の方法がすでに開発されており、いずれの方法を用いてもよい。

【0011】また、近年、合成に必要なヌクレオチドや試薬のキット更には自動合成機器も市販されているので、当然これらを用いてもよい。

【0012】次にこの合成DNAを宿主に導入し、増殖、発現させるために適当なプラスミドに組み込む。

【0013】本発明において用いられるプラスミドは特に限定されないが大腸菌を宿主とする場合は通常よく利用されるpSC101、pBR322、pUC19、pUC18、pHSG298、pHSG299、pHSG398、pHSG399等を用いればよい。

【0014】また枯草菌を宿主とする場合には、pUB110、pC194、pE194等を用いればよい。

【0015】バチルス・プレビスを宿主とする場合は、pHY500、pNU200(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3589(1989))等を用いればよい。もちろん、繰り返し述べるが、本発明は上記プラスミドベクターに限定されるもの

ではない。

【0016】次に、このようにして得た組み換えDNAで宿主を形質転換するのである。形質転換法として①細胞を塩化カルシウム、塩化ルビジウム、または磷酸カルシウムで処理する方法(塩化カルシウム、塩化ルビジウム、または磷酸カルシウム法)、②電気パルスによる方法(エレクトロポレーション法)、③プロトプラストを利用する方法(プロトプラスト法)等の方法があるが、いずれの方法を用いてもよい。またその他の方法を用いてもよい。最後にこの形質転換体を培地中で培養して菌体内に生産もしくは培地中に分泌させ、それを精製するのであるが、このプロセスは通常用いられる以下の方法に従えばよい。

【0017】培地は適当な炭素源、窒素源、無機塩類、使用菌株が特に要求する物質を含んだものを用いればよい。培養時間は使用菌株によって多少異なり特に限定されないが、通常5時間から100時間程度でよい。

【0018】生成物の取り上げ方法は、菌体内に顆粒状に生産させた場合は、集菌後菌体をリゾチーム、超音波等で処理して破砕し、低速遠心によって顆粒を沈澱、採取し、尿素や塩酸グアニジン等で処理して可溶化する。それを希釈や透析等によって巻き戻しを行い、通常よく用いられるHPLC法等によって精製すればよい。培地に分泌生産した場合は、菌体を除去後、培地から通常よく用いられるHPLC法等によって精製すればよい。

【0019】以下、本発明を実施例に従って具体的に説明する。

【0020】

【実施例1】

【全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の構築】

遺伝子の設計

現在の合成DNA技術と、本発明者らの採用している精製法では安定して得られるDNA鎖は最大70塩基程度である。ヒト血清アルブミンは585アミノ酸であるので1755塩基の遺伝子が少なくとも必要であり、少なくとも25本程度に分割して合成する必要がある。また2本鎖としてプラスミドに組み込む必要があるため、その2倍のDNAを合成する必要がある。またプラスミドに組み込んだ時点で塩基配列の確認が必要なので確実に塩基配列が確認できる長さに分けてプラスミドに組み込む方が操作上都合がよい。従って全体を一度に組み立てるのではなく、8つ程度の部分に分けてフラグメントの集合を行い、そこで塩基配列の確認を行ってから全体を構築することにした。

【0021】以上の前提条件をもとに、

①ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列を変化させない。

②集合させる時に用いる制限酵素の認識部位を必要なだけ持たせる。

【0022】(不必要な認識部位を除く。)

③N末端のなるべく近くに遺伝子内で単一の制限酵素部

5

6

位を1つ持たせる。(様々な発現システムへ容易に遺伝子を接続することを可能にする。)

④安定な2次構造を取らないようにする。

⑤大腸菌で汎用されている遺伝子暗号をなるべく用いる。

の順番に条件を考慮しながら遺伝子の設計を行った。ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列は複数の文献によって開示されているが、それらは互いに少しずつの相違がある (FEBS LETTERS 58, 134, (1975)、Nucleic Acids Research 9, 6103, (1981)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 71, (1982)、J. Biol. Chem. 261, 6747, (1986))。

【0023】本発明者らは、一般にDNAの配列を求める方がアミノ酸の配列を求めるよりも信頼性が高いと考えられること、報告されている年次が新しいことの2つの理由により、アミノ酸配列そのものを決定した文献ではなく、mRNAより作製したcDNAの塩基配列を決定することによってアミノ酸配列を報告している比較的  
20 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995

1、(1982)を主に参考にした。

【0024】しかし、上述の2つの文献に示されたcDNAから類推されるアミノ酸配列にも2ヶ所の相違点がある。すなわち1つは胎児の肝臓から取ったmRNAから類推したもの (Nucleic Acids Research 9, 6103 (1981))、もう1つは成人の肝臓から取ったmRNAから類推したもの (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 71, (1982))である。

【0025】本発明者らは実用性を考えて成人の配列を採用した。コンピュータを用いてアミノ酸配列から取り得る制限酵素部位を検索し、それをもとにして大腸菌で汎用されているコドンを選びながら制限酵素部位の取捨選択を行い、DNA配列の最初の候補を作成した。

【0026】その候補配列をコンピュータの高次構造検索プログラムに入力し、著しい二次構造を検索し、取り除いた。最終的に決定した遺伝子の塩基配列を図1に示した。

【0027】この設計した遺伝子でのコドンの使用割合を以下に示した。

【0028】

【表1】

<u>TTT-Phe 1(0.17%)</u>	<u>TCT-Ser15(2.56%)</u>
<u>TAT-Tyr 0(0.00%)</u>	<u>TGT-Cys 0(0.00%)</u>
<u>TTC-Phe30(5.13%)</u>	<u>TCC-Ser 8(1.37%)</u>
<u>TAC-Tyr18(3.08%)</u>	<u>TGC-Cys35(5.98%)</u>
<u>TTA-Leu 0(0.00%)</u>	<u>TCA-Ser 1(0.17%)</u>
<u>TAA-*** 0(0.00%)</u>	<u>TGA-*** 0(0.00%)</u>
<u>TTC-Leu 0(0.00%)</u>	<u>TGG-Ser 0(0.00%)</u>
<u>TAG-*** 0(0.00%)</u>	<u>TGG-Trp 1(0.17%)</u>
<u>CTT-Leu 3(0.51%)</u>	<u>CCT-Pro 0(0.00%)</u>
<u>CAT-His 0(0.00%)</u>	<u>CGT-Arg13(2.22%)</u>
<u>CTC-Leu 1(0.17%)</u>	<u>CCC-Pro 0(0.00%)</u>
<u>CAC-His16(2.74%)</u>	<u>CGC-Arg10(1.71%)</u>
<u>CTA-Leu 3(0.51%)</u>	<u>CCA-Pro 1(0.17%)</u>
<u>CAA-Gln 1(0.17%)</u>	<u>CSA-Arg 1(0.17%)</u>
<u>CTG-Leu54(9.23%)</u>	<u>CGG-Pro23(3.93%)</u>
<u>CAG-Gln19(3.25%)</u>	<u>CGG-Arg 0(0.00%)</u>
<u>ATT-Ile 0(0.00%)</u>	<u>ACT-Thr 7(1.20%)</u>
<u>AAT-Asn 0(0.00%)</u>	<u>ACT-Ser 0(0.00%)</u>
<u>ATC-Ile 8(1.37%)</u>	<u>ACG-Thr21(3.59%)</u>
<u>AAC-Asn17(2.91%)</u>	<u>ACC-Ser 0(0.00%)</u>
<u>ATA-Ile 0(0.00%)</u>	<u>ACA-Thr 0(0.00%)</u>
<u>AAA-Lys58(9.91%)</u>	<u>ACA-Arg 0(0.00%)</u>
<u>ATG-His 6(1.03%)</u>	<u>ACG-Thr 0(0.00%)</u>
<u>AAG-Lys 2(0.34%)</u>	<u>AGG-Arg 0(0.00%)</u>
<u>GTT-Val17(2.91%)</u>	<u>GCT-Ala22(3.76%)</u>
<u>GAT-Asp 1(0.17%)</u>	<u>GGT-Gly 9(1.54%)</u>
<u>GTC-Val 1(0.17%)</u>	<u>GCC-Ala 0(0.00%)</u>
<u>GAG-Asp35(5.98%)</u>	<u>GCG-Gly 3(0.51%)</u>
<u>GTA-Val18(3.22%)</u>	<u>GCA-Ala22(3.76%)</u>
<u>GAA-Gln57(9.74%)</u>	<u>GGA-Gly 0(0.00%)</u>
<u>GTG-Val10(1.71%)</u>	<u>GCG-Ala18(3.08%)</u>
<u>GAG-Gln 4(0.68%)</u>	<u>GGG-Gly 0(0.00%)</u>

【0029】下線を施した部分は、大腸菌で大量に発現するとされている遺伝子に広く用いられているコドン（メジャーコドン）と、一種類しかない、メチオニン、トリプトファン、それにコドンユースーに片寄りが見られないシステインのコードである（参考文献：細胞工学，2，1541（1983））。上記のようにほとんどメジャーコドンを用いて遺伝子を設計することができ

た。アミノ酸配列のもとにした文献のヒト血清アルブミンをコードするエクソン部分のDNA配列について同じことを行なうと以下のようになり、大腸菌におけるメジャーコドンの使用頻度はむしろ低いことが判明した。

【0030】

【表2】

<u>TTT-Phe21(3.58%)</u>	<u>TCT-Ser 3(0.51%)</u>
<u>TAT-Tyr12(2.05%)</u>	<u>TGT-Gly15(2.56%)</u>
<u>TTC-Phe10(1.71%)</u>	<u>TCC-Ser 5(0.85%)</u>
<u>TAG-Ile 6(1.02%)</u>	<u>TGC-Gly20(3.41%)</u>
<u>TTA-Leu10(1.71%)</u>	<u>TGA-Ser 6(1.02%)</u>
<u>TAA-*** 1(0.17%)</u>	<u>TGA-*** 0(0.00%)</u>
<u>ITG-Leu12(2.05%)</u>	<u>TGG-Ser 2(0.34%)</u>
<u>TAG-*** 0(0.00%)</u>	<u>TGG-Trp 1(0.17%)</u>
<u>CTT-Leu18(3.07%)</u>	<u>CCT-Pro10(1.71%)</u>
<u>CAT-His11(1.88%)</u>	<u>CGT-Arg 2(0.34%)</u>
<u>CTC-Leu 5(0.85%)</u>	<u>CCC-Pro 6(1.02%)</u>
<u>CAC-His 5(0.85%)</u>	<u>CGC-Arg 1(0.17%)</u>
<u>CTA-Leu 4(0.68%)</u>	<u>CCA-Pro 7(1.19%)</u>
<u>CAA-Gln10(1.71%)</u>	<u>CGA-Arg 2(0.34%)</u>
<u>CTG-Leu12(2.05%)</u>	<u>CCG-Pro 1(0.17%)</u>
<u>CAG-Gln10(1.71%)</u>	<u>CGC-Arg 2(0.34%)</u>
<u>ATT-Ile 3(0.51%)</u>	<u>AGT-Thr 7(1.19%)</u>
<u>AAT-Asn10(1.71%)</u>	<u>AGT-Ser 6(1.02%)</u>
<u>ATC-Ile 4(0.68%)</u>	<u>AGC-Thr 7(1.19%)</u>
<u>AAC-Asn 7(1.19%)</u>	<u>AGC-Ser 2(0.34%)</u>
<u>ATA-Ile 1(0.17%)</u>	<u>ACA-Thr12(2.05%)</u>
<u>AAA-Lys41(7.00%)</u>	<u>AGA-Arg13(2.22%)</u>
<u>ATG-His 6(1.02%)</u>	<u>ACG-Thr 2(0.34%)</u>
<u>AAG-Lys19(3.24%)</u>	<u>AGG-Arg 4(0.68%)</u>
<u>GTT-Val11(1.88%)</u>	<u>GCT-Ala29(4.95%)</u>
<u>GAT-Asp25(4.27%)</u>	<u>GCT-Gly 2(0.34%)</u>
<u>GTC-Val 7(1.19%)</u>	<u>GCC-Ala14(2.39%)</u>
<u>GAC-Asp11(1.88%)</u>	<u>GGC-Gly 3(0.51%)</u>
<u>GTA-Val 7(1.19%)</u>	<u>GCA-Ala17(2.90%)</u>
<u>GAA-Glu37(6.31%)</u>	<u>GGA-Gly 6(1.02%)</u>
<u>GTG-Val16(2.73%)</u>	<u>GGG-Ala 2(0.34%)</u>
<u>GAG-Glu24(4.10%)</u>	<u>GGG-Gly 1(0.17%)</u>

【0031】さて、図1に示した配列において、最初にあるAAGCTTのHindIII部位は遺伝子構築の便宜上、付加したものである。またN末端近くにユニークな制限酵素部位を導入する目的で、認識部位と切断部位とが離れているFokIを図2のように導入して切り離すようにした。

【0032】FokIは認識部位の9塩基/13塩基(上側鎖/下側鎖)3'側を切断するので、認識部位を図2のようにアミノ酸配列の5'に隣接して置くことにより血清アルブミン遺伝子のN末端近くで切断できるようになる。ただしこのためには、遺伝子中のFokI認識配列を全て除いておく必要がある。

【0033】遺伝子全体の構築に用いる制限酵素はHindIII, KpnI, SalI, PstI, XbaI, SphI, BamHIとした。これらの酵素での切断点地図を図3に示した。

#### 【0034】DNAの化学合成

設計したDNA配列(図1)を図4のようにフラグメン

トに分割し、Applied Biosystems社のDNA合成機を用いて各々のフラグメントの両鎖をホスホアミダイト法(Tetrahedron Letters 22, 1859 (1981))によりそれぞれ合成した。

#### 【0035】遺伝子の構築

合成したDNAの260nmの吸光度を測定して濃度を決定した後に、1回の操作で約100ピコモルを用いた。図3、4に示した制限酵素で8つのブロックにわけ、各ブロックを構成する各断片の両鎖をアニールし、T4リガーゼでライゲーションして各ブロックに相当する断片を生成させ、それらをpUC18もしくはpUC19にクローン化した。クローン化した各ブロックのDNA配列をジデオキシ法(Science, 214, 1205 (1981))によって少なくとも2回にわたって確認した後、各ブロックの断片を調製した。次に各断片約1μgとpUC18またはpUC19約1μgを用いてライゲーションを行い、ブロック1、2、3とプロ

11

ック4、5と、ブロック6、7、8とをそれぞれ連結した中間的ブロックをpUC18またはpUC19にクローン化した。最後に3つの中間的ブロック約1 $\mu$ gとpUC19約1 $\mu$ gを用いてライゲーションを行い、全ブロックを連結した目的の遺伝子を含むプラスミドpHSAを構築した(図3)。

【0036】

【実施例2】

【全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大腸菌での発現】

前出の方法と合成機を用いて図5に示すような合成DNA 10 Aを作成した。なお、同図中、SDはリボソーム結合部位を表す。次にこの合成DNAと先ほど作成したプラスミドpHSA及びプラスミドpT13s(Nco)(J. Biochem., 104, 30(1988))とから図6に示すように発現プラスミドpSDHSA4を作成した。なお、プラスミドpT13s(Nco)は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている保持菌株AJ12447(FERM P-10757)から調製した。

【0037】この発現プラスミドpSDHSA4の調製の 20 詳細は以下の通りである。即ち、pHSAをFokIとBamHIで切断し、最も大きな断片(合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大部分を含む約1.8kb断片)を調製する。一方、pT13s(Nco)をClaIとBamHIで切断し、大きい方の断片(trpプロモーター、ターミネーター、アンピシリン耐性遺伝子を含む約2.6kb断片)を調製する。この両者と図5に示した合成DNAとをT4リガーゼでライゲーションしてpSDHSA4を構築した。

【0038】このようにして得られたプラスミドpSD 30 HSA4は、trpプロモーター-オペレーターの制御下、Met残基に成熟型HSAが直接連結した蛋白を発現するように設計されており、転写ターミネーターとしてtrpAターミネーターを備えている。

【0039】次にこの発現プラスミドpSDHSA4で通常よく用いられる塩化リブジウム法を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、形質転換株HB101/pSDHSA4を得た。この株をグルコース、酵母エキス、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、ピタ 40 ミンB1を含む培地で培養した。培養開始後4時間でインドールアクリル酸による誘導をかけ、誘導後約15時間培養したところ、菌体内に顆粒が生成していた。

【0040】集菌後、20mM Tris-HCl 30mM NaCl 0.5M EDTAバッファーに懸濁し、0.25mg/mlリゾチームで0℃1時間処理後、超音波破碎した。顆粒を低速遠沈後、20mM Tris-HCl 30mM NaCl 0.5M EDTAバッファーにて洗浄、再び遠沈し、10mM EDTA溶液に懸濁し、顆粒画分とした。

【0041】図7(A)はHB101、HB101/p 50

12

SDHSA4の全菌体蛋白及び顆粒画分をSDSポリアクリルアミド電気泳動した図である。図中の1、2、3、Mの略号は以下の通りである。

【0042】1. HB101全菌体蛋白

2. HB101/pSDHSAE12全菌体蛋白

3. HB101/pSDHSAE12顆粒画分

M. 分子量マーカー

HB101/pSDHSA4の菌体蛋白には、宿主のHB101には見られない分子量約67Kのバンドが認められ、それは、顆粒画分に回収されている。ヒト血清アルブミンの分子量は約67Kであり、予定された分子量の蛋白が顆粒として生成していることがわかった。

【0043】図7(A)と同様の電気泳動後(蛋白量は1/30)、抗HSA抗体でウェスタンブロッティングを行なうと図7(B)のようなパターンになり、顆粒状生成した蛋白は抗ヒト血清アルブミン抗体と反応することが示された。

【0044】顆粒を6M塩酸グアニジンで可溶化し、ジチオスレイトールを加えて(final 0.1M)100℃2分処理後、逆相HPLCで顆粒蛋白を精製した。これをアミノ酸シーケンサーにかけ、N末端付近のアミノ酸配列を調べたところ、図8のように、調べた16アミノ酸残基の全てが一致した。なお、同図中、Observedは実際に観察された配列を、Predictedは予定した配列をそれぞれ示す。

【0045】以上のことから、大腸菌においてN末端にMet残基の付加した形でヒト血清アルブミンを顆粒状に生成することができたことが示唆された。

【0046】形質転換株HB101/pSDHSA4(AJ12498)は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている(FERM P-11208)。

【0047】顆粒を6Mグアニジンで可溶化後、1Mジチオスレイトールを1/10量加えて100℃2分で還元を行い、逆相HPLCによって定量したところ本培養によるヒト血清アルブミンの生成量は15~20mg/L/O.Dであった。特開昭61-275229には、大腸菌における最高生成量5~10mg/L/O.Dが記載されている。本発明による生成量は、この最高生成量を2倍以上上回るものである。

【0048】

【実施例3】

【ヒト血清アルブミンの枯草菌における分泌生産】

本発明者らは、まず枯草菌のベクターとして多用されるpUB110(J. Bacteriol. 134, 318(1978))と大腸菌のベクターpBR327(Gene 9, 287(1980))とをEcoRI部位で連結し、大腸菌と枯草菌の両方で複製可能なシャトルベクターpBU4371を構築した。pBU4371は、大腸菌ではアンピシリン耐性、枯草菌ではカナマイシン耐性を賦与する(図9)。



【0049】枯草菌の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 amyE のうち、 $\alpha$ -アミラーゼの発現と分泌に必要な部分は、約 0.4 kb の領域に存在しており、大腸菌  $\beta$ -lactamase を枯草菌で分泌するプラスミド pTUB256 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 134, 624, (1986)) では、この領域が 0.4 kb HindIII 断片として得られる。

【0050】図10は、 $\alpha$ -アミラーゼの分泌に必須であり分泌時には切り離されるシグナルペプチドの切断点 (A1a33) 付近のアミノ酸配列及びDNA配列を示している。任意のタンパク質の遺伝子を介在配列なしにシグナルペプチド切断点の直後に連結するためには、切断点の直前と目的遺伝子のN末端の直後に、アミノ酸配列を変えることなくユニークな制限酵素部位を配置し、その間を切断点とN末端を丁度つなげるようなアミノ酸配列をコードする合成DNAで連結するとよい。切断点付近のアミノ酸配列から考えられるDNA配列をもとに可能な制限酵素部位を検索したところ、HapII部位の直後、A1a30をコードする配列をGCTからGCCに置換することによって唯一のNotI部位が導入できることが判った。

【0051】そこで、図11のような合成DNAをApplied Biosystems社製のDNA合成機を用いて作製し、次に図12のようにして汎用分泌ベクターpASEC1を構築した。pASEC1は、これをNotIとSmaIで切断し、任意の目的遺伝子の3'末端を平滑化してN末端付近の適当な制限酵素Eで切断しておき、両者を5'末端がNotI cohesiveで3'末端が制限酵素Eに合うような合成DNAで連結することによって、amyEのシグナルペプチド切断点と任意の目的蛋白とが直接連結した遺伝子を構築することができるようになっている。

#### 【0052】HSA分泌プラスミドの構築

まず図13に示すような2本の合成DNAを作製した。この2つの合成DNAと実施例1で構築した全合成ヒト血清アルブミン遺伝子を含むプラスミドpHSA (図3参照) 及びプラスミドpUC19とから、プラスミドpUC33HSAを構築した (図13)。

【0053】このプラスミドpUC33HSAの構築の詳細を以下に示す。

【0054】即ち、pHSAをFokIとBamHIで切断し、最も大きな断片 (合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大部分を含む1.8 kb断片) を調製する。一方、pUC19をBamHIとHindIIIで切断しておく。これらと図13中に示した2本の合成DNAとをT4リガーゼで連結し、目的のプラスミドpUC33HSAを構築した。

【0055】さて次にプラスミドpUC33HSAを制限酵素BamHIで処理した後にクレノウ処理し、次いでNotIで処理することによって得られた1.8 kb

の断片と、プラスミドpASEC1をNotI, SmaIで処理して得た7.5 kbの断片とをT4リガーゼを用いて結合させた。このようにして得られたプラスミドがヒト血清アルブミン分泌プラスミドpAMY33HSA4である (図14)。

【0056】枯草菌によるヒト血清アルブミンの分泌  
当業者ならば容易に入手し得る枯草菌1A510株 (J. Bacteriol. 165, 934 (1983)) を上述のプラスミドpAMY33HSA4でプロトプラスト法により形質転換し、形質転換株1A510/pAMY33HSA4を得た。

【0057】このようにして得た形質転換株1A510/pAMY33HSA4とコントロールとしてプラスミドpBU4371を有する形質転換株1A510/pBU4371との両方をトリプトン、酵母エキス、NaCl、カゼインを含む培地で37℃で振盪培養した。14, 16, 18時間で培養液をサンプリングし、培養上清を1 $\mu$ lずつ1回及び5回ナイロンメンブランにスポットして抗ヒト血清アルブミン抗体を用いてドットイムノプロットングを行なったところ、図15に示すように、ヒト血清アルブミンが培地に分泌生成していたことが確認された。なお、同図中においてStandardは、SIGMAのEssential globulin free HUMAN Albuminを用いた。Brothの位置には、培地をスポットした。図中の1, 2, 4, 5の位置には1A510/pAMY33HSA4を、3, 6の位置には1A510/pBU4371をそれぞれスポットした。

【0058】形質転換株1A510/pAMY33HSA4 (AJ12493) と1A510/pBU4371 (AJ12492) は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている。その寄託番号は、1A510/pAMY33HSA4がFERMP-11207で、1A510/pBU4371がFERMP-11206である。

【0059】

【実施例4】

【全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の構築】

#### 遺伝子の設計

実施例1と同様の順番に条件を考慮しながら遺伝子の設計を行った。ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列は複数の文献によって開示されているが、それらは互いに少しずつの相違がある (FEBS LETTERS 58, 134, (1975), Nucleic Acids Research 9, 6103, (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 71, (1982), J. Biol. Chem. 261, 6747, (1986))。

【0060】本発明者らは、一般にDNAの配列を求める方がアミノ酸の配列を求めるよりも信頼性が高いと考

15

えられること、mRNAから逆転写によって作成されるcDNAでは、逆転写の際に塩基の間違いが生じ易いこと、報告された年次が新しいことの3つの理由により、ヒト染色体上のアルブミン遺伝子のDNA塩基配列とアミノ酸配列を決定した文献に報告されているアミノ酸配列が最も信頼性が高いと判断し、J. Biol. Chem. 261, 6747, (1986)に報告されたアミノ酸配列を採用した。

【0061】コンピュータを用いてアミノ酸配列から取り得る制限酵素部位を検索し、それをもとにして大腸菌\*10

TTT-Phe 1 ( .17%)	TCT-Ser 15 ( 2.55%)	TAT-Tyr 0 ( .00%)	TGT-Cys 0 ( .00%)
TTC-Phe 30 ( 5.10%)	TCC-Ser 8 ( 1.38%)	TAC-Tyr 18 ( 3.08%)	TGC-Cys 35 ( 5.95%)
TTA-Leu 0 ( .00%)	TCA-Ser 1 ( .17%)	TAA-*** 0 ( .00%)	TGA-*** 0 ( .00%)
TTG-Leu 0 ( .00%)	TGG-Ser 0 ( .00%)	TAG-*** 0 ( .00%)	TGG-Trp 1 ( .17%)
CTT-Leu 3 ( .51%)	CCT-Pro 0 ( .00%)	CAT-His 0 ( .00%)	CGT-Arg 3 ( 2.21%)
CTC-Leu 1 ( .17%)	CCC-Pro 0 ( .00%)	CAC-His 16 ( 2.72%)	CGC-Arg 10 ( 1.70%)
CTA-Leu 3 ( .51%)	CCA-Pro 1 ( .17%)	CAA-Gln 1 ( .17%)	CGA-Arg 1 ( .17%)
CTG-Leu 54 ( 9.18%)	CCG-Pro 23 ( 3.81%)	CAG-Gln 18 ( 3.23%)	CGG-Arg 0 ( .00%)
ATT-Ile 0 ( .00%)	ACT-Thr 7 ( 1.19%)	AAT-Asn 0 ( .00%)	AGT-Ser 0 ( .00%)
ATC-Ile 8 ( 1.38%)	ACC-Thr 1 ( .17%)	AAC-Asn 17 ( 2.89%)	AGC-Ser 0 ( .00%)
ATA-Ile 0 ( .00%)	ACA-Thr 0 ( .00%)	AAA-Lys 57 ( 9.69%)	AGA-Arg 0 ( .00%)
ATG-Met 6 ( 1.02%)	ACG-Thr 0 ( .00%)	AAG-Lys 2 ( .34%)	AGG-Arg 0 ( .00%)
GTT-Val 17 ( 2.89%)	GCT-Ala 22 ( 3.74%)	GAT-Asp 1 ( .17%)	GGT-Gly 8 ( 1.53%)
GTC-Val 1 ( .17%)	GCC-Ala 0 ( .00%)	GAC-Asp 35 ( 5.95%)	GGC-Gly 3 ( .51%)
GTA-Val 13 ( 2.21%)	GCA-Ala 22 ( 3.74%)	GAA-Glu 58 ( 9.88%)	GGA-Gly 0 ( .00%)
GTG-Val 10 ( 1.70%)	GCG-Ala 8 ( 1.38%)	GAG-Glu 4 ( .68%)	GGG-Gly 0 ( .00%)

【0065】下線を施した部分は、大腸菌で大量に発現するとされている遺伝子に広く用いられているコドン(メジャーコドン)と、一種類しかない、メチオニン、トリプトファン、それにコドンユースエジに片寄りが見られないシステインのコードである(参考文献:細胞工学, 2, 1541 (1983))。上記のようにほとんどメジャーコドンを用いて遺伝子を設計することができ※

TTT-Phe 21 ( 3.58%)	TCT-Ser 3 ( .51%)	TAT-Tyr 12 ( 2.05%)	TGT-Cys 15 ( 2.58%)
TTC-Phe 10 ( 1.71%)	TCC-Ser 5 ( .85%)	TAC-Tyr 6 ( 1.02%)	TGC-Cys 20 ( 3.41%)
TTA-Leu 10 ( 1.71%)	TCA-Ser 8 ( 1.02%)	TAA-*** 1 ( .17%)	TGA-*** 0 ( .00%)
TTG-Leu 12 ( 2.05%)	TGG-Ser 2 ( .34%)	TAG-*** 0 ( .00%)	TGG-Trp 1 ( .17%)
CTT-Leu 17 ( 2.89%)	CCT-Pro 10 ( 1.71%)	CAT-His 1 ( .17%)	CGT-Arg 2 ( .34%)
CTC-Leu 6 ( 1.02%)	CCC-Pro 6 ( 1.02%)	CAC-His 5 ( .85%)	CGC-Arg 1 ( .17%)
CTA-Leu 4 ( .68%)	CCA-Pro 7 ( 1.19%)	CAA-Gln 1 ( .17%)	CGA-Arg 2 ( .34%)
CTG-Leu 2 ( .34%)	CCG-Pro 1 ( .17%)	CAG-Gln 8 ( 1.38%)	CGG-Arg 2 ( .34%)
ATT-Ile 3 ( .51%)	ACT-Thr 7 ( 1.19%)	AAT-Asn 1 ( .17%)	AGT-Ser 6 ( 1.02%)
ATC-Ile 4 ( .68%)	ACC-Thr 6 ( 1.02%)	AAC-Asn 8 ( 1.38%)	AGC-Ser 2 ( .34%)
ATA-Ile 1 ( .17%)	ACA-Thr 1 ( .17%)	AAA-Lys 40 ( 6.83%)	AGA-Arg 13 ( 2.22%)
ATG-Met 6 ( 1.02%)	ACG-Thr 2 ( .34%)	AAG-Lys 19 ( 3.24%)	AGG-Arg 4 ( .68%)
GTT-Val 12 ( 2.05%)	GCT-Ala 29 ( 4.85%)	GAT-Asp 25 ( 4.27%)	GGT-Gly 2 ( .34%)
GTC-Val 7 ( 1.19%)	GCC-Ala 14 ( 2.39%)	GAC-Asp 11 ( 1.88%)	GGC-Gly 3 ( .51%)
GTA-Val 7 ( 1.19%)	GCA-Ala 17 ( 2.89%)	GAA-Glu 38 ( 6.44%)	GGA-Gly 6 ( 1.02%)
GTG-Val 15 ( 2.58%)	GCG-Ala 2 ( .34%)	GAG-Glu 24 ( 4.10%)	GGG-Gly 1 ( .17%)

【0067】さて、図16に示した配列において、最初にあるAAGCTTのHindIII部位は遺伝子構築の便宜上、付加したものである。またN末端近くにユニークな制限酵素部位を導入する目的で、認識部位と切断部位とが離れているFokIを図2のように導入して切り離すようにした。

【0068】FokIは認識部位の9塩基/13塩基(上側鎖/下側鎖)3'側を切断するので、認識部位を図2のようにアミノ酸配列の5'に隣接して置くことにより血清アルブミン遺伝子のN末端近くで切断できるようになる。ただしこのためには、遺伝子中のFokI認識配列を全て除いておく必要がある。

【0069】遺伝子全体の構築に用いる制限酵素はHindIII, KpnI, SalI, PstI, Xba

\*で汎用されているコドンを選びながら制限酵素部位の取捨選択を行い、DNA配列の最初の候補を作成した。

【0062】その候補配列をコンピュータの高次構造検索プログラムに入力し、著しい二次構造を検索し、取り除いた。最終的に決定した遺伝子の塩基配列を図16に示した。

【0063】この設計した遺伝子でのコドンの使用割合を以下に示した。

【0064】

【表3】

20※た。アミノ酸配列のもとにした文献のヒト血清アルブミンをコードするエクソン部分のDNA配列について同じことを行なうと以下のようになり、大腸菌におけるメジャーコドンの使用頻度はむしろ低いことが判明した。

【0066】

【表4】

I, SphI, BamHIとした。これらの酵素での切断地点図を図17に示した。

【0070】DNAの化学合成

40 設計したDNA配列(図16)を図18のようにフラグメントに分割し、Applied Biosystems社のDNA合成機を用いて各々のフラグメントの両鎖をホスホアミダイト法(Tetrahedron Letters 22, 1859 (1981))によりそれぞれ合成した。

【0071】遺伝子の構築

合成したDNAの260nmの吸光度を測定して濃度を決定した後に、1回の操作で約100ピコモルを用いた。図17, 18に示した制限酵素で8つのブロックにわけ、各ブロックを構成する各断片の両鎖をアニール

し、T4リガーゼでライゲーションして各ブロックに相当する断片を生成させ、それらをpUC18もしくはpUC19にクローン化した。クローン化した各ブロックのDNA配列をジデオキシ法 (Science, 214, 1205 (1981)) によって少なくとも2回にわたって確認した後、各ブロックの断片を調製した。次に各断片約1μgとpUC18またはpUC19約1μgを用いてライゲーションを行い、ブロック1, 2, 3とブロック4, 5と、ブロック6, 7, 8とをそれぞれ連結した中間的ブロックをpUC18またはpUC19にクローン化した。最後に3つの中間的ブロック約1μgとpUC19約1μgを用いてライゲーションを行い、全ブロックを連結した目的の遺伝子を含むプラスミドpHSAE2を構築した (図17)。

[0072]

【実施例5】[全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大腸菌での発現(1)]

前出の方法と合成機を用いて図5に示すような合成DNAを作成した。なお、同図中、SDはリボソーム結合部位を表す。次にこの合成DNAと先ほど作成したプラスミドpHSAE2及びプラスミドpT13s (Nco) (J. Biochem., 104, 30 (1988)) とから図19に示すように発現プラスミドpSDHSAE12を作成した。なお、プラスミドpT13s (Nco) は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている保持菌株AJ12447 (FERMP-10757) から調製した。

[0073] この発現プラスミドpSDHSAE12の調製の詳細は以下の通りである。即ち、pHSAE2をFokIとBamHIで切断し、最も大きな断片 (合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大部分を含む約1.8kb断片) を調製する。一方、pT13s (Nco) をClaIとBamHIで切断し、大きい方の断片 (trpプロモーター、ターミネーター、アンピシリン耐性遺伝子を含む約2.6kb断片) を調製する。この両者と図5に示した合成DNAとをT4リガーゼでライゲーションしてpSDHSAE12を構築した。

[0074] このようにして得られたプラスミドpSDHSAE12は、trpプロモーター-オペレーターの制御下、Met残基に成熟型HSAが直接連結した蛋白を発現するように設計されており、転写ターミネーターとしてtrpAターミネーターを備えている。

[0075] 次にこの発現プラスミドpSDHSAE12で通常よく用いられる塩化リビジウム法を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、形質転換株HB101/pSDHSAE12を得た。この株をグルコース、酵母エキス、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、ビタミンB1を含む培地で培養した。培養開始後4時間でインドールアクリル酸による誘導をかけ、誘導後約15時間培養したところ、菌体内に顆粒が生成してい

た。

[0076] 集菌後、20mM Tris-HCl 30mM NaCl 0.5M EDTAバッファーに懸濁し、0.25mg/mlリゾチームで0℃1時間処理後、超音波破碎した。顆粒を低速遠沈後、20mM Tris-HCl 30mM NaCl 0.5M EDTAバッファーにて洗浄、再び遠沈し、10mM EDTA溶液に懸濁し、顆粒画分とした。

[0077] 図7(A)はHB101, HB101/pSDHSAE12の全菌体蛋白及び顆粒画分をSDSポリアクリルアミド電気泳動した図である。図中の1, 2, 3, Mの略号は以下の通りである。

[0078]

1. HB101全菌体蛋白
2. HB101/pSDHSAE12全菌体蛋白
3. HB101/pSDHSAE12顆粒画分
- M. 分子量マーカー

HB101/pSDHSAE12の菌体蛋白には、宿主のHB101には見られない分子量約67Kのバンドが認められ、それは、顆粒画分に回収されている。ヒト血清アルブミンの分子量は約67Kであり、予定された分子量の蛋白が顆粒として生成していることがわかった。

[0079] 図7(A)と同様の電気泳動後 (蛋白量は1/30)、抗HSA抗体でウェスタンブロッティングを行なうと図7(B)のようなパターンになり、顆粒生成した蛋白は抗ヒト血清アルブミン抗体と反応することが示された。

[0080] 顆粒を6M塩酸グアニジンで可溶化し、ジチオスレイトールを加えて (final 0.1M) 100℃2分処理後、逆相HPLCで顆粒蛋白を精製した。これをアミノ酸シーケンサーにかけ、N末端付近のアミノ酸配列を調べたところ、図8のように、調べた16アミノ酸残基の全てが一致した。なお、同図中、Observedは実際に観察された配列を、Predictedは予定した配列をそれぞれ示す。

[0081] 以上のことから、大腸菌においてN末端にMet残基の付加した形でヒト血清アルブミンを顆粒状に生成することができたことが示唆された。

[0082] 形質転換株HB101/pSDHSAE12 (AJ12576) は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている (FERM P-11804)。

[0083] 顆粒を6Mグアニジンで可溶化後、1Mジチオスレイトールを1/10量加えて100℃2分で還元を行い、逆相HPLCによって定量したところ本培養によるヒト血清アルブミンの生成量は15~20mg/L/O.Dであった。特開昭61-275229には、大腸菌における最高生成量5~10mg/L/O.Dが記載されている。本発明による生成量は、この最高生成量を2倍以上上回るものである。

[0084]

## 【実施例6】

【ヒト血清アルブミンの枯草菌における分泌生産】

本発明者らは、まず枯草菌のベクターとして多用される pUB110 (J. Bacteriol. 134, 318 (1978)) と大腸菌のベクター pBR327 (Gene 9, 287 (1980)) とを EcoRI 部位で連結し、大腸菌と枯草菌の両方で複製可能なシャトルベクター pBU4371 を構築した。pBU4371 は、大腸菌ではアンピシリン耐性、枯草菌ではカナマイシン耐性を賦与する (図9)。

【0085】枯草菌の  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 amyE のうち、 $\alpha$ -アミラーゼの発現と分泌に必要な部分は、約 0.4 kb の領域に存在しており、大腸菌  $\beta$ -lactamase を枯草菌で分泌するプラスミド pTUB256 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 134, 624, (1986)) では、この領域が 0.4 kb HindIII 断片として得られる。

【0086】図10は、 $\alpha$ -アミラーゼの分泌に必須であり分泌時には切り離されるシグナルペプチドの切断点 (Ala33) 付近のアミノ酸配列及び DNA 配列を示している。任意のタンパク質の遺伝子を介在配列なしにシグナルペプチド切断点の直後に連結するためには、切断点の直前と目的遺伝子の N 末端の直後に、アミノ酸配列を変えることなくユニークな制限酵素部位を配置し、その間を切断点と N 末端を丁度つなげるようなアミノ酸配列をコードする合成 DNA で連結するとよい。切断点付近のアミノ酸配列から考えられる DNA 配列をもとに可能な制限酵素部位を検索したところ、HapII 部位の直後、Ala30 をコードする配列を GCT から GCC に置換することによって唯一の NotI 部位が導入できることが判った。

【0087】そこで、図11のような合成 DNA を Applied Biosystems 社製の DNA 合成機を用いて作製し、次に図12のようにして汎用分泌ベクター pASEC1 を構築した。pASEC1 は、これを NotI と SmaI で切断し、任意の目的遺伝子の 3' 末端を平滑化して N 末端付近の適当な制限酵素 E で切断しておき、両者を 5' 末端が NotI cohesive で 3' 末端が制限酵素 E に合うような合成 DNA で連結することによって、amyE のシグナルペプチド切断点と任意の目的蛋白とが直接連結した遺伝子を構築することができるようになっている。

## 【0088】HSA 分泌プラスミドの構築

まず図20に示すような2本の合成 DNA を作製した。この2つの合成 DNA と実施例4で構築した全合成ヒト血清アルブミン遺伝子を含むプラスミド pHSAE2 (図17参照) 及びプラスミド pUC19 とから、プラスミド pUC33HSAE を構築した (図20)。

【0089】このプラスミド pUC33HSAE の構築の詳細を以下に示す。

【0090】即ち、pHSAE2 を FokI と BamHI で切断し、最も大きな断片 (合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大部分を含む 1.8 kb 断片) を調製する。一方、pUC19 を BamHI と HindIII で切断しておく。これらと図20中に示した2本の合成 DNA とを T4 リガーゼで連結し、目的のプラスミド pUC33HSAE を構築した。

【0091】さて次にプラスミド pUC33HSAE を制限酵素 BamHI で処理した後にクレノウ処理し、次いで NotI で処理することによって得られた 1.8 kb の断片と、プラスミド pASEC1 を NotI, SmaI で処理して得た 7.5 kb の断片とを T4 リガーゼを用いて結合させた。このようにして得られたプラスミドがヒト血清アルブミン分泌プラスミド pAMY33HSAE2 である (図21)。

## 【0092】枯草菌によるヒト血清アルブミンの分泌

当業者ならば容易に入手し得る枯草菌 1A510 株 (J. Bacteriol. 165, 934 (1983)) を上述のプラスミド pAMY33HSAE2 でプロトプラスト法により形質転換し、形質転換株 1A510/pAMY33HSAE2 を得た。

【0093】このようにして得た形質転換株 1A510/pAMY33HSAE2 とコントロールとしてプラスミド pBU4371 を有する形質転換株 1A510/pBU4371 との両方をトリプトン、酵母エキス、NaCl、カゼインを含む培地で 37℃ で振盪培養した。14, 16, 18 時間で培養液をサンプリングし、培養上清を 1  $\mu$ l ずつ 1 回及び 5 回ナイロンメンブランにスポットして抗ヒト血清アルブミン抗体を用いてドットイムノブロッティングを行なったところ、図15に示すように、ヒト血清アルブミンが培地に分泌生成していたことが確認された。なお、同図中において Standard は、SIGMA の Essential globulin free HUMAN Albumin を用いた。Broth の位置には、培地をスポットした。図中の 1, 2, 4, 5 の位置には 1A510/pAMY33HSAE2 を、3, 6 の位置には 1A510/pBU4371 をそれぞれスポットした。

【0094】形質転換株 1A510/pAMY33HSAE2 (AJ12578) と 1A510/pBU4371 (AJ12492) は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている。その寄託番号は、1A510/pAMY33HSAE2 が FERM P-11806 で、1A510/pBU4371 が FERM P-11206 である。

## 【0095】

【実施例7】 [全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の枯草菌での発現 (2)]

大腸菌でのもう1つの発現プラスミドを図22のようにして構築した。即ち、まず実施例5で構築したプラスミ

21

pSDHASE12のtrpAターミネーターを含む0.3kb BamHI-HincII断片をpHSG 299のBamHI-HincIIサイトに連結し、pKT91を構築する。次にpSDHASE12のtrpプロモーターを含む80bp EcoRI-ClaI断片と、ヒト血清アルブミン遺伝子を含む1.8kb ClaI-BamHI断片とをpKT91のEcoRI-BamHIサイトに連結し、目的のプラスミドpKT91HSAE4を得た。

【0096】次にこの発現プラスミドpKT91HSAE4で通常よく用いられる塩化ルビジウム法を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、形質転換株HB101/pKT91HSAE4を得た。この株を実施例5と同様な培地で培養を行ったところ、やはり菌体内に顆粒が生成した。

【0097】実施例5と同様に顆粒を調製し、同様にヒト血清アルブミンの定量を行ったところ、生成量は80~90mg/L/O. Dであり、実施例5の生成量をさらに4倍以上上回るものであった。

【0098】HB101/pKT91HSAE4 (AJ 12577) は、工業技術院微生物工業研究所に寄託さ

22

れている (FERM P-11805)。

【0099】

【発明の効果】原核生物が好んで用いるコドンを多用するようにしてデザインした合成DNAを用いて目的とするヒト血清アルブミンを生産させる本発明は、cDNAを用いてヒト血清アルブミンを微生物に生産させる従来の方法の不完全さを是正し、より効率的な蛋白質生産を行う上で極めて重要なものである。

【0100】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：1781

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：cleavage-site

存在位置：21..26

特徴を決定した方法：S

配列

【0101】

## 配列表 (配列番号 1)

```

      10      20      30      40
5' AA GCCTGGGATG GAC GCT CAC AAA TCC GAA GTT GCG CAC CGT TTT AAA
      Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys

      50      60      70      80      90
GAC CTG GGT GAG GAA AAC TTC AAA GCG CTG GTT CTG ATC GCT TTC GCT
Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala

      100     110     120     130     140
CAG TAC CTT CAG CAG TGC CCG TTC GAG GAC CAC GTT AAA CTG GTA AAC
Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn

      150     160     170     180     190
GAA GTA ACC GAA TTC GCT AAA ACC TGC GTA GCT GAC GAA TCT GCA GAA
Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu

      200     210     220     230     240
AAC TGC GAC AAA TCC CTG CAC ACC CTG TTC GGT GAC AAA CTG TGC ACT
Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr

      250     260     270     280
GTT GCG ACC CTG CCG GAA ACC TAC CGT GAA ATG GCT GAC TGC TGC GCT
Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala

      290     300     310     320     330
AAA CAG GAA CCG GAA CCG AAC GAA TGC TTC CTT CAG CAC AAA GAC GAC
Lys Gln Gln Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp

      340     350     360     370     380
AAC CCG AAC CTG CCG CCG CTG GTT CGT CCG GAA GTC GAC GTA ATG TGC
Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys

      390     400     410     420     430
ACC GCA TTC CAC GAC AAC GAA GAA ACC TTC CTG AAA AAA TAC CTG TAC
Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Gln Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr

      440     450     460     470     480
GAA ATC GCA CCG CGT CAC CCG TAC TTC TAC GCA CCG GAA CTG CTG TTC
Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe

```

[0102]

25

26

490            500            510            520  
 TTC GCT AAA CGT TAC AAA GCA GCT TTC ACT GAA TGC TGC CAG GCG  
 Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala  
  
 530            540            550            560            570  
 GCT GAC AAA GCG GCA TGC CTG CTG CCG AAA CTG GAC GAA CTG CGT GAC  
 Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp  
  
 580            590            600            610            620  
 GAA GGT AAG GCG TCT TCT GCA AAA CAG CGT CTG AAA TGC GCT TCT CTC  
 Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu  
  
 630            640            650            660  
 CAG AAA TTC GGT GAA CGT GCA TTC AAA GCG TGG GCA GTT GCG CGC CTG  
 Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu  
  
 670            680            690            700            710  
 TCC CAG CGC TTC CCG AAA GCA GAA TTC GCA GAA GTG TCT AAA CTG GTT  
 Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val  
  
 720            730            740            750            760  
 ACT GAC CTG ACC AAA GTT CAC ACC GAA TGC TGC CAC GGC GAC CTT CTA  
 Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu  
  
 770            780            790            800            810  
 GAG TGC GCA GAC GAC CGT GCG GAC CTG GCG AAA TAC ATC TGC GAA AAC  
 Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn  
  
 820            830            840            850            860  
 CAG GAC TCC ATC TCT TCT AAA CTG AAA GAA TGC TGC GAA AAA CCG CTG  
 Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu  
  
 870            880            890            900  
 CTG GAA AAA TCT CAC TGC ATC GCA GAA GTA GAA AAC GAC GAA ATG CCG  
 Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro  
  
 910            920            930            940            950  
 GCG GAT CTG CCG TCT CTG GCG GCT GAC TTC GTT GAA TCA AAA GAC GTG  
 Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val

[0103]

27 28

960 970 980 990 1000  
TGC AAA AAC TAC GCA GAA GCA AAA GAC GTA TTC CTA GGT ATG TTC CTG  
Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu

1010 1020 1030 1040 1050  
TAC GAA TAC GCT CGT CGA CAC CCG GAC TAC TCT GTG GTT CTG CTG CTG  
Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu

1060 1070 1080 1090 1100  
CGC CTG GCA AAA ACC TAC GAA ACT ACC CTG GAA AAA TGC TGC GCA CCG  
Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala

1110 1120 1130 1140 1150  
GCT GAC CCA CAC GAA TGC TAC GCA AAA GTG TTC GAC GAA TTC AAA CCG CTG  
Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu

1160 1170 1180 1190 1200  
GTT GAA GAA CCG CAG AAC CTG ATC AAA CAG AAC TGC GAA CTG TTC AAA  
Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Lys

1210 1220 1230 1240  
CAG CTG GGT GAA TAC AAA TTC CAG AAC GCT CTG CTG GTT CCG TAC ACC  
Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr

1250 1260 1270 1280 1290  
AAA AAG GTA CCG CAG GTG TCT ACT CCG ACC CTG GTG GAA GTA TCC CGT  
Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg

1300 1310 1320 1330 1340  
AAC CTG GGT AAA GTT GGC TCT AAA TGC TGC AAA CAC CCG GAA CCG AAA  
Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys

1350 1360 1370 1380 1390  
CGT ATG CCG TGC GCG GAA GAC TAC CTG TCC GTG GTG CTG AAC CAG CTG  
Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu

1400 1410 1420 1430 1440  
TGC GTT CTG CAC GAA AAA ACC CCG GTT TCT GAC CGT GTA ACT AAA TGC  
Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys

[0104]



29

30

1450 1460 1470 1480  
TGC ACC GAA TCT CTG GTT AAC CGC CGT CCG TGC TTC TCC GCT CTA GAG  
Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu

1490 1500 1510 1520 1530  
GTT GAC GAA ACC TAC GTA CCG AAA GAA TTC AAC GCA GAA ACC TTC ACT  
Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr

1540 1550 1560 1570 1580  
TTC CAC GCG GAC ATC TGC ACC CTG TCC GAA AAA GAA CCG CAG ATC AAA  
Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys

1590 1600 1610 1620 1630  
AAA CAG ACC GCT CTG GTG GAA CTG GTA AAA CAC AAA CCG AAA GCA ACC  
Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr

1640 1650 1660 1670 1680  
AAA GAA CAA CTG AAA GCG GTG ATG GAC GAC TTC GCA GCT TTC GTA GAA  
Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu

1690 1700 1710 1720  
AAA TGC TGC AAA GCT GAC GAC AAA GAA ACC TGC TTC GCT GAA GAA GCT  
Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly

1730 1740 1750 1760 1770  
AAA AAA CTG GTA GCT GCG TCT CAG GCT GCA CTG GGC CTG TAATGATAGG  
Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

1780  
ATCC 3'

【0105】配列番号: 2

配列の長さ: 1781

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号: cleavage-site

存在位置: 21..26

特徴を決定した方法: S

30 配列

【0106】

31

32

## 配列表 (配列番号2)

10	20	30	40
5' AA GCTTGGGATG GAC GCT CAC AAA TCC GAA GTT GCG CAC CGT TTT AAA			
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys			
50	60	70	80
GAC CTG GGT GAG GAA AAC TTC AAA GCG CTG GTT CTG ATC GCT TTC GCT			
Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala			
100	110	120	130
CAG TAC CTT CAG CAG TGC CCG TTC GAG GAC CAC GTT AAA CTG GTA AAC			
Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn			
150	160	170	180
GAA GTA ACC GAA TTC GCT AAA ACC TGC GTA GCT GAC GAA TCT GCA GAA			
Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu			
200	210	220	230
AAC TGC GAC AAA TCC CTG CAC ACC CTG TTC GGT GAC AAA CTG TGC ACT			
Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr			
250	260	270	280
GTT GCG ACC CTG CCG GAA ACC TAC GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGC GCT			
Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala			
290	300	310	320
AAA CAG GAA CCG GAA CCG AAC GAA TGC TTC CTT CAG CAC AAA GAC GAC			
Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp			
340	350	360	370
AAC CCG AAC CTG CCG CCG CTG GTT CGT CCG GAA GTC GAC GTA ATG TGC			
Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys			
390	400	410	420
ACC GCA TTC CAC GAC AAC GAA GAA ACC TTC CTG AAA AAA TAC CTG TAC			
Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr			
440	450	460	470
GAA ATC GCA CCG CGT CAC CCG TAC TTC TAC GCA CCG GAA CTG CTG TTC			
Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe			

[0107]

33

34

490            500            510            520  
 TTC GCT AAA CGT TAC AAA GCA GCT TTC ACT GAA TGC TGC CAG GCG  
 Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala

530            540            550            560            570  
 GCT GAC AAA GCG GCA TGC CTG CTG CCG AAA CTG GAC GAA CTG CGT GAC  
 Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp

580            590            600            610            620  
 GAA GGT AAG GCG TCT TCT GCA AAA CAG CGT CTG AAA TGC GCT TCT CTC  
 Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu

630            640            650            660  
 CAG AAA TTC GGT GAA CGT GCA TTC AAA GCG TGG GCA GTT GCG CGC CTG  
 Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu

670            680            690            700            710  
 TCC CAG CGC TTC CCG AAA GCA GAA TTC GCA GAA GTG TCT AAA CTG GTT  
 Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val

720            730            740            750            760  
 ACT GAC CTG ACC AAA GTT CAC ACC GAA TGC TGC CAC GGC GAC CTT CTA  
 Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu

770            780            790            800            810  
 GAG TGC GCA GAC GAC CGT GCG GAC CTG GCG AAA TAC ATC TGC GAA AAC  
 Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn

820            830            840            850            860  
 CAG GAC TGC ATC TCT TCT AAA CTG AAA GAA TGC TGC GAA AAA CCG CTG  
 Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu

870            880            890            900  
 CTG GAA AAA TCT CAC TGC ATC GCA GAA GTA GAA AAC GAC GAA ATG CCG  
 Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro

910            920            930            940            950  
 GCG GAT CTG CCG TCT CTG GCG GCT GAC TTC GTT GAA TCA AAA GAC GTG  
 Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val

[0108]

35  
 960 970 980 990 1000  
 TGC AAA AAC TAC GCA GAA GCA AAA GAC GTA TTC CTA GGT ATG TTC CTG  
 Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu

1010 1020 1030 1040 1050  
 TAC GAA TAC GCT CGT CGA CAC CCG GAC TAC TCT GTG GTT CTG CTG CTG  
 Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu

1060 1070 1080 1090 1100  
 CGC CTG GCA AAA ACC TAC GAA ACT ACC CTG GAA AAA TGC TGC GCA GCG  
 Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala

1110 1120 1130 1140 1150  
 GCT GAC CCA CAC GAA TGC TAC GCA AAA GTG TTC GAC GAA TTC AAA CCG CTG  
 Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu

1160 1170 1180 1190 1200  
 GTT GAA GAA CCG CAG AAC CTG ATC AAA CAG AAC TGC GAA CTG TTC GAA  
 Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu

1210 1220 1230 1240  
 CAG CTG GGT GAA TAC AAA TTC CAG AAC GCT CTG CTG GTT CCG TAC ACC  
 Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr

1250 1260 1270 1280 1290  
 AAA AAG GTA CCG CAG GTG TCT ACT CCG ACC CTG GTG GAA GTA TCC CGT  
 Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg

1300 1310 1320 1330 1340  
 AAC CTG GGT AAA GTT GGC TCT AAA TGC TGC AAA CAC CCG GAA GCG AAA  
 Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys

1350 1360 1370 1380 1390  
 CGT ATG CCG TGC GCG GAA GAC TAC CTG TCC GTG GTG CTG AAC CAG CTG  
 Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu

1400 1410 1420 1430 1440  
 TGC GTT CTG CAC GAA AAA ACC CCG GTT TCT GAC CGT GTA ACT AAA TGC  
 Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys

[0109]

37

38

1450            1460            1470            1480  
 TGC ACC GAA TCT CTG GTT AAC CGC CGT CCG TGC TTC TCC GCT CTA GAG  
 Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu  
  
 1490            1500            1510            1520            1530  
 GTT GAC GAA ACC TAC GTA CCG AAA GAA TTC AAC GCA GAA ACC TTC ACT  
 Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr  
  
 1540            1550            1560            1570            1580  
 TTC CAC GCG GAC ATC TGC ACC CTG TCC GAA AAA GAA CGC CAG ATC AAA  
 Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys  
  
 1590            1600            1610            1620            1630  
 AAA CAG ACC GCT CTG GTG GAA CTG GTA AAA CAC AAA CCG AAA GCA ACC  
 Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr  
  
 1640            1650            1660            1670            1680  
 AAA GAA CAA CTG AAA GCG GTG ATG GAC GAC TTC GCA GCT TTC GTA GAA  
 Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu  
  
 1690            1700            1710            1720  
 AAA TGC TGC AAA GCT GAC GAC AAA GAA ACC TGC TTC GCT GAA GAA GGT  
 Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly  
  
 1730            1740            1750            1760            1770  
 AAA AAA CTG GTA GCT GCG TCT CAG GCT GCA CTG GGC CTG TAATGATAGG  
 Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu  
  
 1780  
 ATCC 3'

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明者らが設計し、実際に全合成して構築した、ヒト血清アルブミンをコードするDNA配列を示す図である。

【図2】ヒト血清アルブミンのN末端付近に単一の制限酵素切断部位を導入するために配置したFokI認識部位と切断部位を示す図である。

【図3】遺伝子中の制限酵素部位の配置を示す図である。なお、矢印はブロック1からブロック8各々の領域と、3つの中間的ブロックの領域、及びpHSAが保持する領域を示す。

【図4】図4Aはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック1から3を示す図である。図4Bはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック4、5を示す図である。図4Cはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック6から8を示す図である。

【図5】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌の発現ベクターに接続するために作製した合成DNAを示す図である。なお、SDは、リボソーム結合部位を表す。

【図6】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpSDHSA4の構築手順を示す図である。なお、プラスミドpT13S(Nco)は、大腸菌

trpプロモーターを含む公知のプラスミドである。

【図7】ポリアクリルアミド電気泳動図及びウェスタンブロッティング図である。詳細に述べると(A)はSDSポリアクリルアミド電気泳動後、クーマシーブルーでタンパク質を染色した図である。また(B)は(A)の1/30量の蛋白を用いて同様の電気泳動後、ゲル内の蛋白をナイロンメンブランにエレクトロトランスファーし、抗ヒト血清アルブミン抗体を用いてウェスタンブロッティングした図である。図中の1, 2, 3, Mの略号は以下の通りである。

1. HB101全菌体蛋白
2. HB101/pSDHSAE12全菌体蛋白
3. HB101/pSDHSAE12顆粒画分
- M. 分子量マーカー

【図8】精製顆粒蛋白のアミノ酸配列を示す図である。Observedは実際に観察された配列、Predictedは予定した配列を示す。

【図9】シャトルベクターpBU4371の構築を示す図である。

【図10】α-アミラーゼの分泌に必須であり分泌時には切り離される、amyEのシグナルペプチドの切断点(A1a33)付近のアミノ酸配列及びDNA配列を示す図である。なお、矢印は、A1a33をコードする配列をGCTからGCCに置換することによってNotI部位が生ずること、及びシグナルペプチド切断点を表わ

す。

【図11】分泌ベクター構築のために作製した合成DNAを示す図である。

【図12】分泌ベクターpASEC1の構築図である。

【図13】pASEC1に接続するためのヒト血清アルブミン遺伝子の構築図である。

【図14】ヒト血清アルブミンを枯草菌で分泌するためのプラスミドpAMY33HSA4の構築図である。

【図15】1A510/pAMY33HSA4または1A510/pAMY33HSAE2及び1A510/pBU4371の培養14, 16, 18時間目の培養上清1μlを1回及び5回ナイロンメンブランにスポットし、抗ヒト血清アルブミン抗体でプロットした図である。Standardsは、SIGMAのEssential globulin free HUMAN Albuminを用いた。Brothの位置には、培地をスポットした。図中の1, 2, 4, 5の位置には1A510/pAMY33HSA4または1A510/pAMY33HSAE2を、3, 6の位置には1A510/pBU4371をそれぞれスポットした。

【図16】本発明者らが設計し、実際に全合成して構築した、ヒト血清アルブミンをコードするDNA配列を示す図である。

【図17】遺伝子中の制限酵素部位の配置を示す図であ

る。なお、矢印はブロック1からブロック8各々の領域と、3つの中間的ブロックの領域、及びpHSAE2が保持する領域を示す。

【図18】図18Aはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック1から3を示す図である。図18Bはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック4, 5を示す図である。図18Cはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック6から8を示す図である。

【図19】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpSDHSAE12の構築手順を示す図である。なお、プラスミドpT13S(Nco)は、大腸菌trpプロモーターを含む公知のプラスミドである。

【図20】pASEC1に接続するためのヒト血清アルブミン遺伝子の構築図である。

【図21】ヒト血清アルブミンを枯草菌で分泌するためのプラスミドpAMY33HSAE2の構築図である。

【図22】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpKT91HSAE4の構築手順を示す図である。

【図1】

```

1' AACCTTGGGA TGGACGCTCA CAAATCEGAA GTTCCGCCACC GTTTTAAAGA CCTGCGTGAG
GAAAAACTTCA AACCGCTGCT TCTGATGCTT TCCCTCAGT ACCTTCAGCA GTCCCGTTTC
GAGGACCAAG TTAACATGCT AAACGAAGTA ACCGAATTTC CTAAAACTTG CTTAGCTGAC
GAATCTGAG AAAAACTGCA CAAATCCCTG CACACCTGCT TCGGTGACAA ACTGTGCACT
GTTGCGACCC TGGCGGAAAC CTACCGTGAA ATGCTGACT GCTGCGCTAA ACAGGAACCC
GAACGCAACG AATGCTTCT TCAACACAAA GACGACAAAC CGAACCTGCC CCGCTGCTT
CGTCCCGAAG TCGACGTAAT GTGACCGGCA TTCCAGGACA ACAGCAAAAC GTTCTGTAAA
AAATACCTCT ACGAATTCGC ACCCGCTCAC CGGTACTTCT ACACACCGCA ACTGCTGTTT
TTCCCTAAAC OTTACAAAC AGCTTTCACT GAATGCTGCC AGCGCGCTGA CAAAGCGGCA
TGCTGTGCTG CCAAACTGCA CCAACTGCTT CACGAAGGTA AGCGCTCTTC TCGAAAAACG
CGCTGAAAT GCGCTTCTCT CCACAAATTC CCGTGAACGT CATTCAAAGG GTGGGCAAGT
GCGCGCTCTT CCGACGCTT CCGGAAAGCA GAATTCGCAG AACTGCTTAA ACTGGTTACT
GACCTGACCA AACTTCAAC CCAATGCTGC CACGCGGACC TTCTACAGTC CGCAGACGAC
CGTCCCGACC TGGCGAAATA CATCTGCGAA AACCAAGACT GCATCTCTTC TAAACTGAAA
GAATGCTGCG AAAAAAGGCT GTTCGAAAAA TCTCACTGCA TCGCAGAAAGT AGAAAAACGAC
CAATGCTGCG CCGATCTGCC GTCTCTGCGG CTTGACTTTC TCTGTAACA ATACGCTGCT
AAAAACTAGC CAGAAAGCAA AGACGTAATC CTAGGTATCT TCTGTAACA ATACGCTGCT
CGACACCGCG ACTACTCTGT GCTTCTCTCT CTGCGCGTGG CAAAAACCTA CCAAACTACC
CTGAAAAAAT GCTGCGGAGC GCTTGACCCA CACGAATGCT ACAGCAAAAGT GTTTCAGCAA
TTCAAAACCG GCTTTGAAGA ACCGCAAGAC CTGATCAAAAC AGAAGTGCBA ACTGTTTCAA
CAGCTGCGTG AATACAAAT CCAGAACGCT CTGCTGCTTC CTTACACCAA AAAGGTACCG
TGCTGCAAAAC ACCCGGAAGC GAACAGTATG CCGTCCCGCG AAGACTACCT GTCCGTGCTG
CTGACCAAGC TGTGCTGCTT GCACGAAAAA ACCCGCGTTT CTGACCGTGT AACTAAATGC
TGCAACGAAT CTCTGCTTAA CCGCGCTCCG TGCTTCTCCG CTCTAGAGCT TCAGCAAAAC
TACCTACCGA AAGAAATCAA CGCAGAAACC TTCACTTTTC ACCCGGACAT CTGCAACCTG
TCCGAAAAAG AACCGCAGAT CAAAAAACAG ACCGCTCTGG TCGAACTGCT AAAAAACAAA
CCGAAAGCAA CCAAGCAACA ACTCAAGCGG GTGATGGAGC ACTTCGACGC TTTCTAGAAA
AAATGCTGCA AAGCTGACCA CAAAGAAACC TGCTTCGCTG AAGCAAGCTAA AAAAAGCTGA
GCTGCGCTTC AGGCTGCACT CCGCTGTAA TCAATGATC 3'

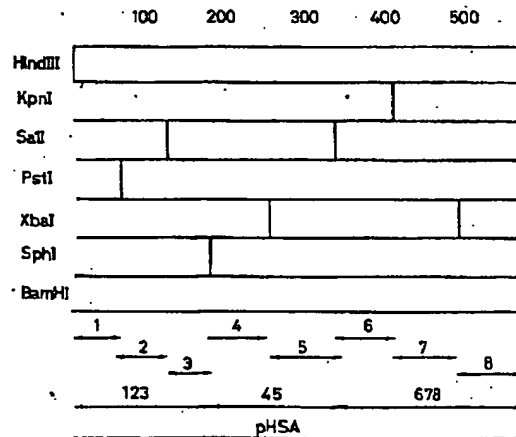
```

【図2】

ヒト血清アルブミンのN末端

AspAlaHisLysSerGluValAlaHisArgPheLysAspLeuGlyGlu  
 AAGCTTGGGATGGACGCTCACAAATCCGAAGTTGCGCACCGTTTTAAAGACCTGGGTGAG  
 TTGGAACCTTAACTGCGAGTGTTTAGGCTTCAACGCGTGGCAAAATTTCTGGACCCACTC  
 FokI 認識部位 切断部位

【図3】



【図11】

NotI SaeI SmaI EcoRI  
 5' CCGCGGGCGCGGAGCTCCCGGGAAATTC  
 CCGCGGGCGCGTCCGAGGGCCCTTAAGAGCT  
 HapII cohesive Sall cohesive

【図5】

SD Met Asp Ala His  
 3' CGATTAGTAAGGAGGTTTAAATGGACGCTCAC  
 TAATCATTCTCCAAATTTACCTGCGAGTGTTTA  
 ClaI cohesive FokI cohesive

【図7】



70-21

Hind III  
 AGCTTGGGATGGACGCTACAAATCCGAAGTCCGCAACGTTTAAAGACCTGGGTGAGGAA  
 ACCCTACCTCGGAGTGTGATGGCTTCAACCGCTGGCAAAATTCTGGACCACTCTCTTTGAGTT  
 AACTTCAAACCGCTGGTCTGATGCTTTCCCTCAAGTACCTTCAAGCATGCGCGTTGAGGA  
 TCGGCACCAAGATGATGCGAAAGCAGTATCGAAGATCGCTACGGGCAAGTCTCTGTCCAAT  
 CCACGTTAACTGCTCAAGCACTAACCAATTCGCTAAACAGTACCTGACGCAATGCA  
 TTGACATTTGCTCTCATGCTTTAAGCATTTGGGACGATCACTGATCTTGA  
 Pst I

プロック4

Spb1  
CTCTGCTCCAAATCGACGAAGTCTGTACGAGCTGAAGGCTCTTCTCGAAA  
ATTACGACGAGCGCTTGTACCTGCTTTCAGCAGCTGTTCTCATTCGACAGAGAGCTTTTGTCCGA  
CAGCGTCTGAATGCTTCTCTCCAGAAATTCCTGACGCTGCATTCAAGC  
ACTTTACGCGAAGAGAGCTTTTAAAGCACTTTCAGCTATGTTTCCGACCGCTC  
GTGGCAATTCGCGCTCTTCCAGGCTTCCGCAAGCAAGATTTCTCAGAAT  
AAGCCGCGCAACAGGCTCGCAAGCGCTTGTCTTAAAGGCTTTCACAGATTG  
GTCTAAAGCTTTACTACGCTGACCAAGTTTCACAGCAAGCTTGGCAAGCGAGCTT  
ACCAATGACTGTGCTGTTTCAAGTCTGGCTTACGAGCTGCTCGCTCGAGATC Xba1

ブロック？

Paix  
GAAATCGCACAAATCCCTGCACACCTGTTCCGTGCACAACTGTCTGCACCTGCGC  
ACCTGTTTTGACCTGTTTAGGCACTGTCTGCACACGCACTGTTGACACGTGCAACCT

GAAGCTACCGTGAATGCTGACTGCTGCGCTAAACAGGAACGGAGACGAACGAATGCTGCT  
CGACCGCGCTTGCGATGCCACTTACGACTGACGAGCGGATTGCTGCTGCGCTGCTGCTGCT  
TGACGACAAAGACGACAAACCGAAGCTGCGCGGCTGCTGCTGCTGCGAAG SalI  
ACCAAGGAAGCTGTGTTGCTGCTGCTGGGCTGCGACGGCGGCGACAGGAGGCTTAGCT

**ブロック5**

CTAGAGTCCGCGACAGACCGTCCGACCTGGCGAAATACATCTCCGAAACCCAGACTCCAT  
TCACCGCTCTGC7GGCAGCGCTTCACCGCTTTATGTAGACGCTTTTGGTCTTGAGGTACAGAGAT

CTCTTCTAACTGAAGAGATGCTGGAAAAACGGCTGTGGAAAAATCTCACTGCATGCCAGAA  
TTGACATCTTCTACGACGCTTTTGGGCGACGCTTTTAGACATCGCTAGCCTTTTCATCTTT  
GTAGAAACCAAGCAAAATCCCGCGAGATCGCGCTCTCTCGCGGTCACTCTGTGTGACAAACAA  
GCTCTTTAGCGCGCGCTAGACGGCAGAGACCGCGACTGAAGCAACTATTTTCTGCACAGTT  
GTGTGCAAAACATACGACGAGAGCAAAAGACCTTCTACGATGATCTGTGACAAATCGCGCTG  
TTTAGTGGCTTCTGTTTCTGTGATAGCTGATACACAGGCACTGCTTATAGCGAGAGCT

ブロッコリ

SalI  
TCGACGTAATGTGACCGCATTCACGACACGAAGAAAGCTTCTGAAAAAAATAC  
CGATTACAGTGGCTGCTAAGCTGTCTGTTCTTCTGGAGGCACTTTTATGCGACATCT  
CTCAGCAATATCCAGCCGCTCACCCTGACTTCTACGACCGGAAGTCTGTTCTTCTG-  
TTAGCTTCCGCACTGGCATGAAGATCGCTGGCTTCCAGACAGGAAGCGATTTCGA  
CTAAACGTTCAAGACGCTTCACTGAA7GTCTCCAGCCGCTTCCAGACAGGCGCATG  
ATGTTTCTCGAAGATCTACGACGCTCCGCGCATGTTTGGC SphI

4B

图 4A

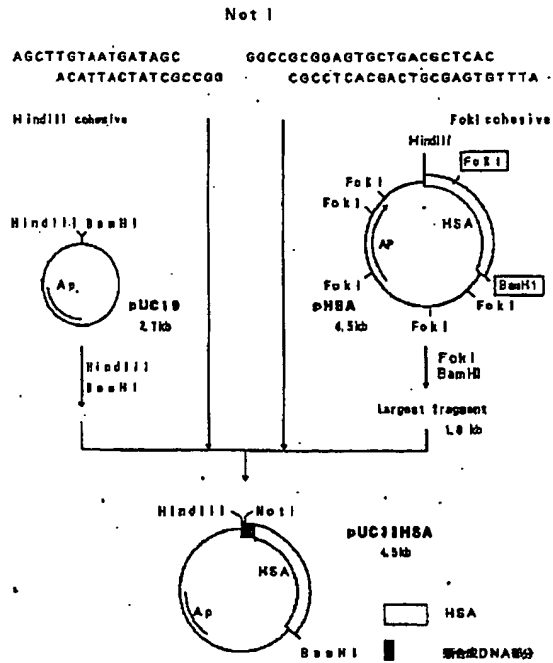
[illegible][illegible][illegible]

圖 4c

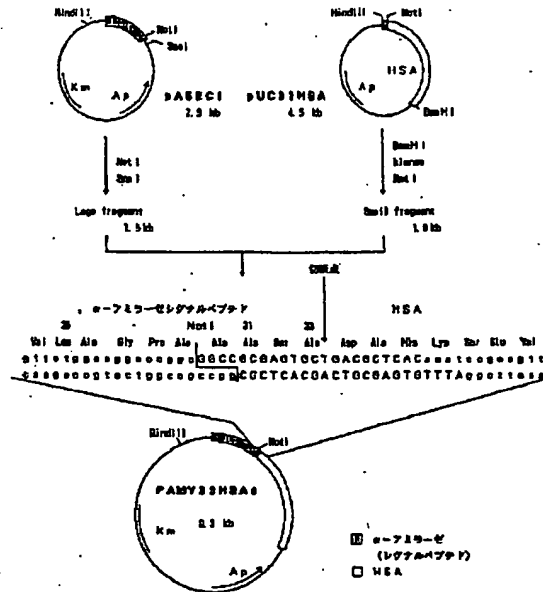




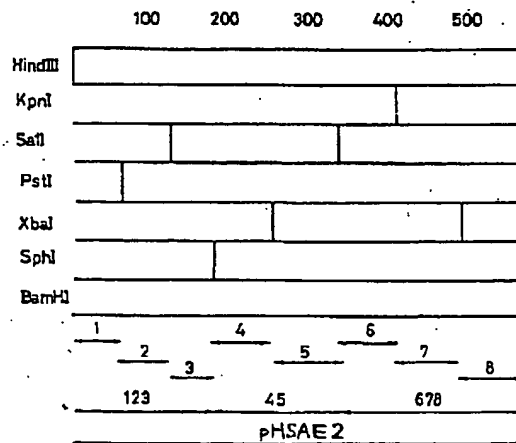
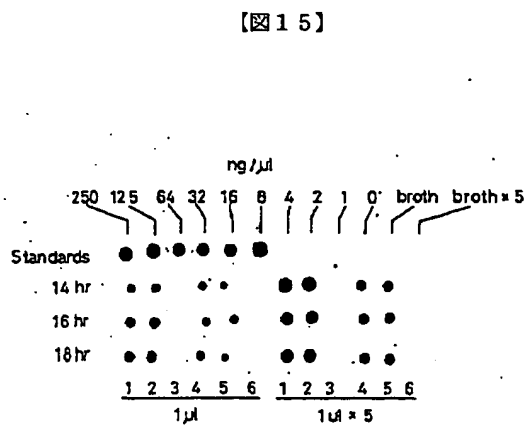
【图 13】



【例 14】



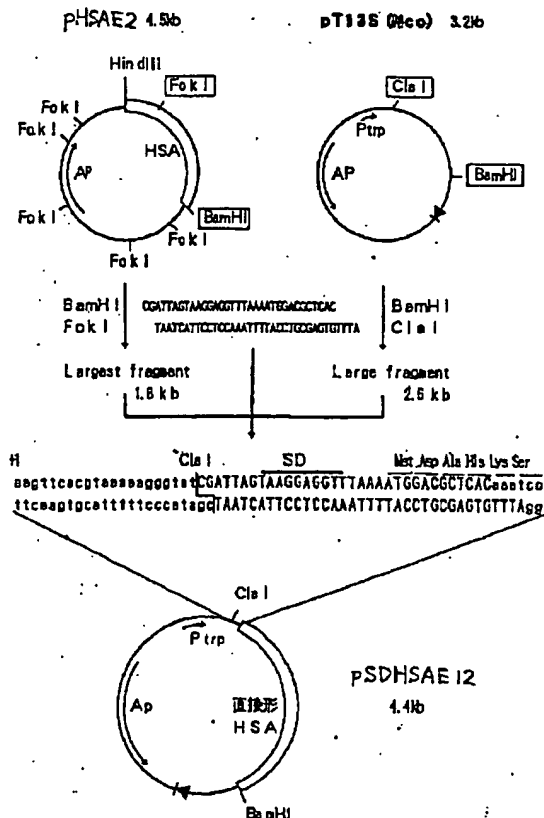
【图 17】



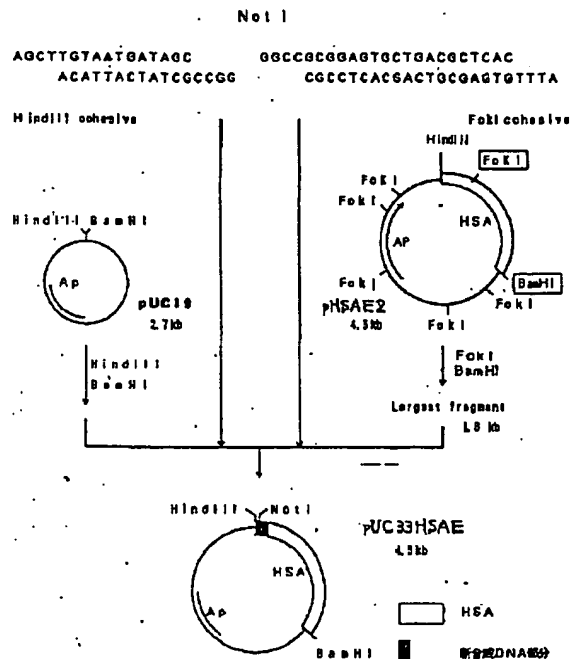
【図16】

5' AAGCTTGGGA TGGACGGTCA CAAATCCGAA GTTCCGCACC GTTTTAAAGA CCTCGGTCAG  
 GAAACTTCA AAGCCCTGCT TCTGATCGCT TTCCCTCAGT ACCTTCAGCA GTGCCCGTTC  
 GAGGACCAAG TTAACCTGGT AAACGAAGTA ACCGAATTCC GTAAAACCTC CCGTAGCTGAC  
 GAATCTGAG AAGAACTGCA CAAATCCCTG CACACCCCTGT TCGGTGACAA ACTGTGCAC  
 GTTCCGACCC TCCCGCAAAE CTACGGTGAA ATGGGTGACT GGTGCCCTAA ACAGGAACCC  
 CAACGCAACG AATGCTTCTT TCAGCAGAAA GACGACAAAC CGAACCTGCC CCGCCTGGTT  
 CGTCCGCAAG TCGACCTAAT GTGCACCCGA TTCCACGACA ACGAAGAAAC GTTCTTGAAA  
 AAATACTGT ACGAATCGC ACCCGCTCAC CCGTACTTET ACACCCCGCA ACTCGTCTTC  
 TTCCGTAAAC GTTACAAAGC AGCTTTCAC TCAATGCTGCC AGCCCGCTGA CAAAGCGGCA  
 TGCTGTGCTG CGAAACTGCA CCAACTGCCG GACGAAGGTA AGCCCTCTTC TGCAAAACAG  
 CGTCTGAAAT GCGCTTCTGT CCAGAAATTC GGTGAACCTG CATTCAAAGC GTGGGCACTT  
 CGCCCGCTGT CCGAGCGCTT CCGCAAAACA GAATTCGCAAG AAGTGTCTAA ACTGGTTACT  
 GACCTGACCA AAGTTACAC CGAATGCTGC CACGCGGACC TTCTACAGTG CCGACACGAC  
 CGTCCGGAAC TGGCGAAATA CATCTGCCAA AACCAGGACT CCACTCTCTT TAAACTGAAA  
 CAACTGCTGC AAAAAGCGCT GCTCGAAAAA TCTCACTGCA TCCGAGAAGT AGAAAACGAC  
 CAATCCGCG CCGATCTGCT GTCTCTGCGG CCGTACTTCC TTGAATCAAA AGACGTGTGC  
 AAAAACTAG CAGAAGCAAA AGACGTATTG CTAGGTATGT TCTGTACGA ATACGCTGCT  
 CGACACCCCG ACTACTCTGT GGTTCCTGCT GTGCCCTGG CAAAAACCTA CGAAACTACC  
 CTGGAAAAAT GTTGGCGGAC GGTGACCCA CACGAATGCT AGCAAAAGT GTTTCGACGA  
 TTCAAAACCG TGGTTGAAGA ACCGACGAAC CTGATCAAC AGAACTGCCA ACTGTTCCAA  
 CAGCTCGCTG AATACAAAT GTTCCGAAAT TCCGTAACG TGGGTAAGT TGGCTCTAAA  
 CAGCTGTCTA CTCGCCCTCT GCTCGAAATA CCGTCCCGG AAGACTAGCT GTCCGTGGTG  
 TCGTGCAGAC ACCCGGAAGC GAAACGTAAG CCGTCCCGG AAGACTAGCT GTCCGTGGTG  
 CTGAACCAAG TGTGCGTCTG GCACGAAAAA ACCCGCTTCT CTGACCGCTG AACTAAATGC  
 TGCACCGAAT CTCTGGTTAA CCGCGGCTCG TGTGCTGCTG CTCTAGAGGT TGACGAAACG  
 TACGTACCGA AAGAATTCAA CCGAGAAAC TTCACTTTC ACCCGGACAT CTGACCCCTG  
 TCCGAAAAAG AACCGCAGAT CAAAAACAG ACCGCTCTCG TGGAACTGGT AAAACACAAA  
 CCGAAAGCAA CCAAAACAA ACTGAAACCG GTGATGGAC ACTTCGCACT TTCTGTAGAA  
 AAATGCTGCA AAGCTGACCA CAAAGAAAC TCGTTCGCTG AAGAAGCTAA AAAACTGATA  
 GCTCGCTCTC AAGCTGCACT CCGCTGTAA TGATAGGATC C 3'

【図19】



【図20】



・ブロック

ブロック4

プロット 2

プロジェクト 5

ブロック3

১৪৪

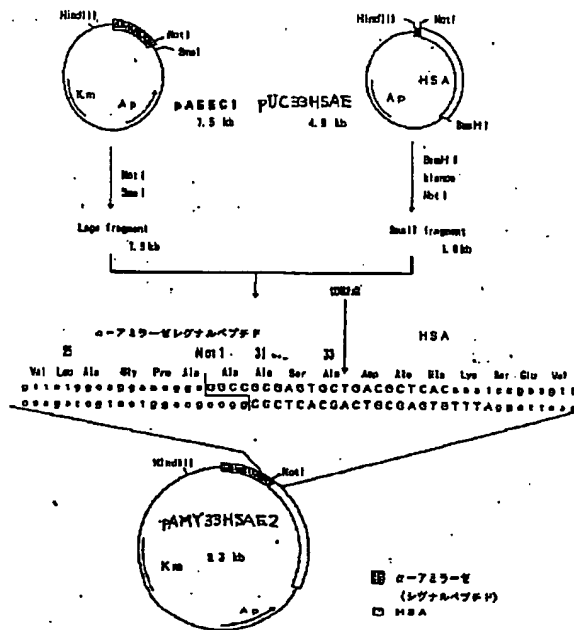
**18A**

7C-91

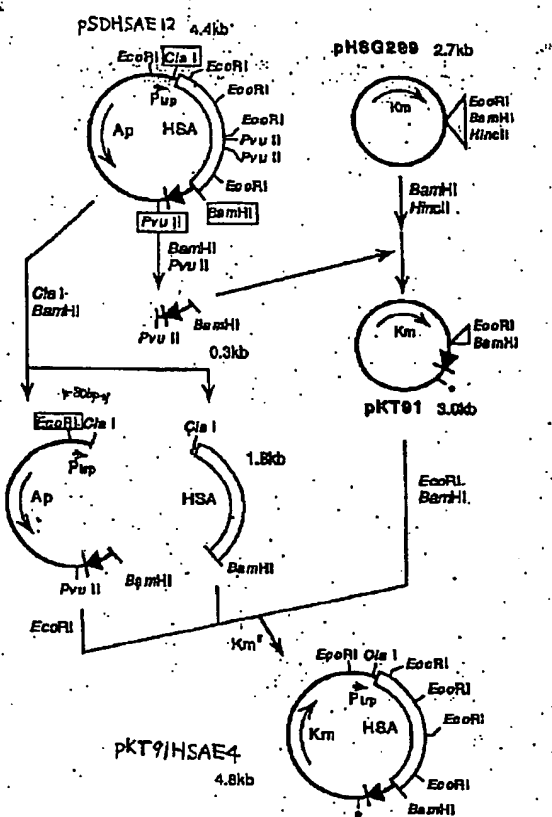
70778

圖 186

【図21】



【図22】



## 【手続補正書】

【提出日】平成3年8月22日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明者らが設計し、実際に全合成して構築した、ヒト血清アルブミンをコードするDNA配列を示す図である。

【図2】ヒト血清アルブミンのN末端付近に単一の制限酵素切断部位を導入するために配置したFokI認識部位と切断部位を示す図である。

【図3】遺伝子中の制限酵素部位の配置を示す図である。なお、矢印はブロック1からブロック8各々の領域と、3つの中間的ブロックの領域、及びpHSAが保持する領域を示す。

【図4A】図4Aはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロッ

ク1を示す図である。

【図4B】図4Bはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック2を示す図である。

【図4C】図4Cはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック3を示す図である。

【図4D】図4Dはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック4を示す図である。

【図4E】図4Eはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック5を示す図である。

【図4F】図4Fはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック6を示す図である。

【図4G】図4Gはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック7を示す図である。

【図4H】図4Hはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック8を示す図である。

【図5】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌の発現ベクターに接続するために作製した合成DNAを示す図である。なお、SDは、リボソーム結合部位を表す。

【図6】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpSDHSA4の構築手順を示す図である。なお、プラスミドpT13S(Nco)は、大腸菌trpプロモーターを含む公知のプラスミドである。

【図7】ポリアクリルアミド電気泳動図及びウェスタンブロッティング図である。詳細に述べると(A)はSDSポリアクリルアミド電気泳動後、クーマシーブルーでタンパク質を染色した図である。また(B)は(A)の1/30量の蛋白を用いて同様の電気泳動後、ゲル内の蛋白をナイロンメンブランにエレクトロトランスファーし、抗ヒト血清アルブミン抗体を用いてウェスタンブロッティングした図である。図中の1, 2, 3, Mの略号は以下の通りである。1. HB101全菌体蛋白 2. HB101/pSDHSAE12全菌体蛋白 3. HB101/pSDHSAE12顆粒画分M. 分子量マーカー

【図8】精製顆粒蛋白のアミノ酸配列を示す図である。Observedは実際に観察された配列、Predictedは予定した配列を示す。

【図9】シャトルベクターpBU4371の構築を示す図である。

【図10】 $\alpha$ -アミラーゼの分泌に必須であり分泌時には切り離される、amyEのシグナルペプチドの切断点(A1a33)付近のアミノ酸配列及びDNA配列を示す図である。なお、矢印は、A1a33をコードする配列をGCTからGCCに置換することによってNotI部位が生ずること、及びシグナルペプチド切断点を表わす。

【図11】分泌ベクター構築のために作製した合成DNAを示す図である。

【図12】分泌ベクターPASEC1の構築図である。

【図13】pASEC1に接続するためのヒト血清アルブミン遺伝子の構築図である。

【図14】ヒト血清アルブミンを枯草菌で分泌するためのプラスミドpAMY33HSA4の構築図である。

【図15】1A510/pAMY33HSA4または1A510/pAMY33HSAE2及び1A510/pBU4371の培養14, 16, 18時間目の培養上清1 $\mu$ lを1回及び5回ナイロンメンブランにスポットし抗ヒト血清アルブミン抗体でブロッティングした図である。Standardsは、SIGMAのEssential globulin free HUMAN Albuminを用いた。Brothの位置には、培地をスポットした。図中の1, 2, 4, 5の位置には1A510/pAMY33HSA4または1A510/pAMY3

3HSAE2を、3, 6の位置には1A510/pBU4371をそれぞれスポットした。

【図16】本発明者らが設計し、実際に全合成して構築した、ヒト血清アルブミンをコードするDNA配列を示す図である。

【図17】遺伝子中の制限酵素部位の配置を示す図である。なお、矢印はブロック1からブロック8各々の領域と、3つの中間的ブロックの領域、及びpHSAE2が保持する領域を示す。

【図18A】図18Aはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック1を示す図である。

【図18B】図18Bはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック2を示す図である。

【図18C】図18Cはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック3を示す図である。

【図18D】図18Dはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック4を示す図である。

【図18E】図18Eはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック5を示す図である。

【図18F】図18Fはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック6を示す図である。

【図18G】図18Gはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック7を示す図である。

【図18H】図18Hはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック8を示す図である。

【図19】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpSDHSAE12の構築手順を示す図である。なお、プラスミドpT13S(Nco)は、大腸菌trpプロモーターを含む公知のプラスミドである。

【図20】pASEC1に接続するためのヒト血清アルブミン遺伝子の構築図である。

【図21】ヒト血清アルブミンを枯草菌で分泌するためのプラスミドpAMY33HSAE2の構築図である。

【図22】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpKT91HSAE4の構築手順を示す図である。

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】

```

5' AAGCTTGGGA TGGACGCTCA CAAATCCGAA GTTGGCGACC GTTTTAAAGA CCTGGGTGAG
GAAAACTTCA AAGCGCTGGT TCTGATCGCT TTGGCTCAAT ACCTTCAGCA GTCCCGGTTG
GAGGACCCAG TTAACCTGGT AAACGAAAGTA ACCGAATTTC CTAAAAACCTG CGTAGCTGAC
GAATCTGAG AAAAACTGGA CAAATCCGCT CACACCCCTGT TGGGTGACAA ACTGTGCACT
GTTGGCAGCC TGGCGCAAAAC CTACCGTGAA ATCGCTCACT GTTGGCTTAA ACAOAAACCG
GAACGCAACC AATGCTTCTT TCACCCACAA GACGACAAAC CAAACCTCCC CCGCTCTCTT
CGTCCGGAAC TGGACGTAAT GTCCACCGCA TTCCACGACA AGGAAAGAAC CTTCCTGAAA
AAATACCTGT ACGAAATCGC ACCCGCTCAC CCGTACTTCT ACCTACCGGA ACTGCTGTTC
TTGGCTAAAC GTTACAAAGC AGCTTTCCTT GAATGCTGCC AGCGCGCTGA CAAAGCGGCA
TGGCTGCTGC CGAACTGGA CGAACTGCTT GACGAAAGTA AGCGCTCTTC TCCAAAACAG
CGTCTGAAT GCGCTTCTCT CCAGAAATTC GGTGAACGTG CATTCAAAGC GTGGCGAGTT
GCGCGCTGT CCGACGCTT CCGCAAGCA GAATTCGAC AACTGTCTAA ACTGCTTACT
CACCTACCA AACTTCACAC CCAATGCTGC CACCGCGACC TTCTAGACTG CCGACAGCAC
CGTCCGGAAC TGGCGAAATA CATCTGCGAA AACCAAGGACT CCACTCTCTT TAAACTGAAA
GAATGCTGCC AAAAACTGCT GCTCGAAAAA TCTCACTGCA TCGCAGAACT AGAAAAACGAC
GAATGCTGCC CCGATCTGCT GTCTCTGCTG GCTGACTGCT TTCAATCAAA AGACCTGTGC
AAAACTACG CAGCAACAAA AGACGTAATC CTAGGTATGT TCCTGTACGA ATACGCTGCT
CGACACCGCG ACTACTCTGT GCTTCTGCTG CTGGCGCTGC CAAAAACCTA CCAAACTACG
CTGAAAAAT GCTGCGCAGC GCTGACCCA CACGAATGCT AGCAAAAGT GTTCGACGAA
TTCAAAACCG TGGTTCAAGA ACCGACAGAC CTGATCAAA AGAACTGCGA ACTGTTCAAA
CAGCTGGGTG AATACAAAT CCAGAACGCT CTGCTGCTTC GCTACACCAA AAAGGTACCG
CAGGTGCTTA CTCCGACCT GGTGGAAGTA TCCCTAAAC TGGCTAAAGT TGGCTCTAAA
TGGTCAAAAC ACCCGGAAGC CAAACGTATG CCGTGGCGCG AAGACTACCT GTCCGTGGTG
CTGAACCAAG TGTGCTTCT CACGAAAAAA ACCCGCTTT CTGACGCTGT AACTAAATCC
TGCACCGAAT CTCTGTTAA CCGCGCTGCG TCGTTCTCG CTCTAGAAGT TGACGAAACG
TACGTACCGA AAGAAATTA CCGCAAAAC TTCACTTTC ACCCGGACAT CTGCACTCTG
TCCGAAAAAG AAGCGCAGAT CAAAAAACAG ACCGCTCTGG TCGAACTGCT AAAAAACAAA
CCGAAAGCAA CCAAAAGCAA ACTGAAAGC GTGATGACG ACTTCGACG TTTCTAGAA
AAATGCTGCA AAGCTGACGA CAAACAAAC TCGTTGCTG AACAAAGTAA AAAAECTGTA
CTGCGCTTC AGGCTGCACT GCGCTCTTAA TGATACGATC C 3'

```

【図2】

ヒト血清アルブミンのN末端

↓

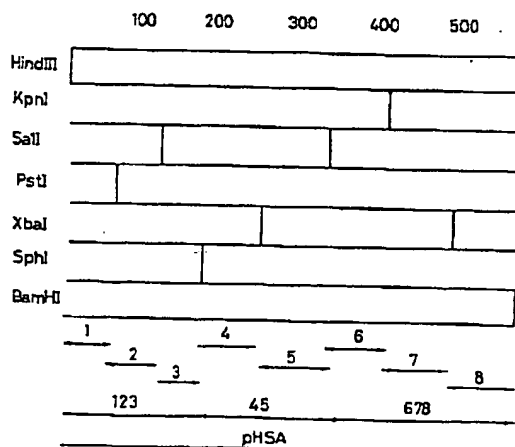
AspAlaHisLysSerGluValAlaHisArgPheLysAspLeuGlyGlu

AAGCTTGGGATGGACGCTCAC[AAATCCGAAGTTGGCGACCGTTTAAACACCTGGGTGAG

TTCCGAACCTTACCTGCGAGTGTTTA]GGCTTCAACCGCTGGCAAAATTTCTGGACCCACTC

FokI 認識部位 切断部位

【図3】



【図4A】

ブロック1

Hind III

AGCTTGGGATGGACGCTCACAAATCCGAAGTTGGCGACCGTTTAAACACCTGGGTGAGAA

ACCTTACCTGCGAGTCTTACCGCTTCAACCGCTGCGAAATTTCTGGACCCACTCTTTTCAAGTT

AACTTCAAAACCGCTGCTTCTGATGCTTTGGCTCACTACCTTCAGCAAGTGGCGCTTGGAG

TCCGACCAAGACTAGCGAAACCGAGTCATGGAAGTCTTACCGCAAGCTCTGCTGCAAT

CCAGCTTAAACTGCTAAACGAAGTAACCGAATTCCTAAACCTGGCTAGCTGACGAATCTGCA

TTGACCAATTTGCTTATGGCTTAACCGATTTTGGACGCAATCGACTGCTTAG PstI

【図4B】

ブロック2

PstI

GAAAACTGGGACAAATCCCTGACACCGCTTTGGGTGACAACTGTGCACTGTTGGACCGTGGG

ACCTCTTTTGAAGCTTTTACCGACCTTGGGCAACCGCACTTTTGAACCTGACAACTCT

GAAACCTACCGTGAATGGCTGACTGCTGGCTAAACAGGAACCGGAACGCAACCAATGCTTCT

GGGACCGCTTTGATGCCACTTACCGACTGACGACGGATTTGTCTTGGCTTGGTTGCTT

TCAGCAAAAGACGACAAACCGAAGCTGCGCGCTGTTGCTGCGGAAG SalI

ACCAAGCAACTGCTGTTCTGCTTTGGCTTGGCGCGCGGACCAAGCAAGCTTCACT

【☒ 4 D】

70774

SpH5  
CTCTGTCGGGAACATGGAGACTGCTGTGACGAGGTAAAGCGTCTTCTCGAAAA  
GTACGACGACGCTTTGAGCTGCTGTGACGACGCTTCTCATTCGCGAGACGCTTTTGTCCGAG  
CAGCGTCTGAATTCGCTTCTCTCGAAAAATTCGGTGACGTCGATCTTAAGGC  
ACTTTTACGCGAAGACGCTTTTAAAGCTTCTGACCTAATCTTTCGACCCGCTC  
GTGGCGAGTTTGGCGCTCTCTCCACGCTCTTCCGCAACGCAATTCGACAGAT  
AAGCGCGGACAGCGTCCGACGCGCTTTCGCTTAAAGCGTCTTACAGATTG  
GTCTAAATCTGTTACTGATCTGTGCAAAATCTACAGCGAGCTGCGCAACGCGCATCT  
ACCAATCATGCACTGCTTCTCAAGTCTGGCTTACGACGAGTGGCGGCTGCGAAGTC XbaI

## 70725

XbaI  
CTAGAGTGGCCAGACGACGCTGCGGACCTGCCGAATACATCTGCGAAACAGGACTCCAT  
TEACCGCTTGCTGGCAGCGCTCGACCGCTTATATGACGCTTTTGTCCTGACGTAAGTAAGAT

CTCTTCTAACTGAAAGAAATGCTGCGAAAACCGCTGCTGCAAAATCTCACTGCATCCGACAA  
TTGACTTTTACCAACGCTTTTTCGCGACGCACTTTTAGAGTGAGTATGGCTTTTCACTTTT

GTAGAAAACGACGAATCCGCGCGATCTCGGCTCTCTGCGCGCTGACTCGTTGAATCAAAAGAC  
GCTGCTTTACGCGCGCTAGACGGCAGAGACCGCGCACTGAAGCAACTTACTTTTCTCCACAGTT

GTGTGCAAAACTACGCAGAACCAAGACGTAATCTTACGTTATGTTCTCTGACCAATACCGTCC  
TTGATGCTCTCTAGCTTTTCTGTCATGAAGTCAATACAGCAAGCACTGTTATCGACAGCT

SaI

## 70,96

[illegible]

70,21

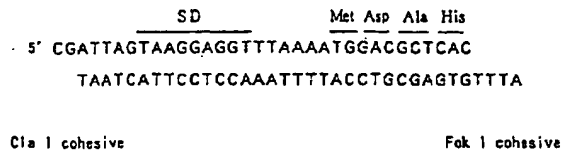
[illegible]

3B-21

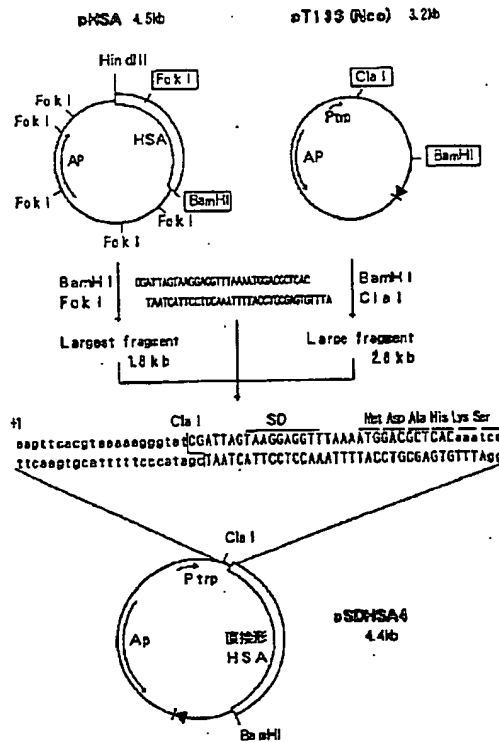
2821  
CTAGAGGTTGACGAAGCTACTGTAACCTTAAGCAATTCAACCCGCAAAAGCT  
TCTAACCTGCTCTTCATGCTGCTCTTTCTTAAGTTCGCTGTTTTCGAACCTGAAG  
TCACTTTTCACCCCGACATCTGCACCTCTCTGCAAAAAACAGCGCAAT  
CTGCGGCTCTATACAGTGGCGCAAGCTTTTCTTCCGCTTACTTTTTTC  
CAAAAAACACACCCCTCTCTGCTGAAGCTGCTAAAAACGAAGCGAAGCA  
TCTCGGCTCTGACCACTCTGCAATTTTTCTGTTTCTGTTGGTTTCT  
ACCAAGAGAAACAACTTCAAAACCTGATGCGACGACTTCCGCAAGTTGGTAT  
TGTTCTTTTCCGCAATCTGCGAAGCTTCAAAAGCATCTTTTACG  
AAAAATGCTGCAAAAGCTGACCAACGAACCTGCTTCTGTAAGAAG  
ACGTTTTCGACTCTCTTTTCTTTCGCAAGCGACTGTTCTCTCTTTT  
TAAAAAATCGTAGCTGCTCTGCACTGCACTGGGCTGTAATCATG  
ACCATCAGCGCAAGCTGCGCACTGACCGCAATCTATCTCTAC BamHI



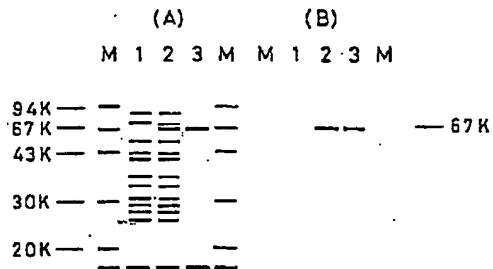
【図5】



【図6】



【図7】

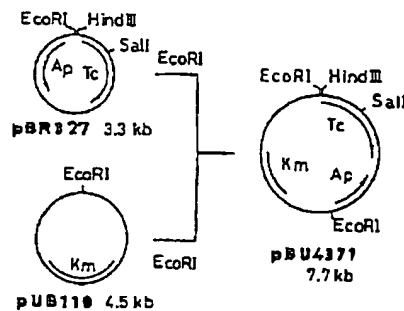


【図8】

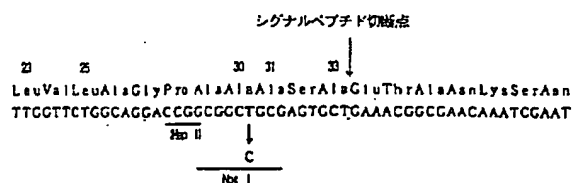
Observed : Met-Asp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-  
 Predicted : Met-Asp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-

Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly  
 Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly

【図9】

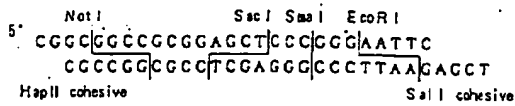


【図10】

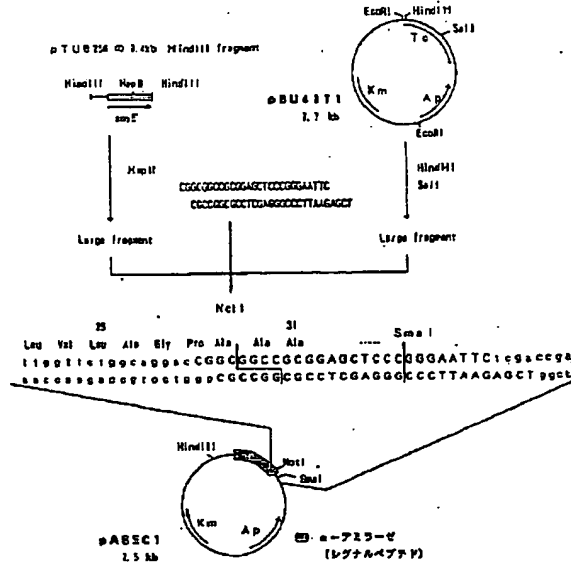


※ 数字はN-末端からのアミノ酸数

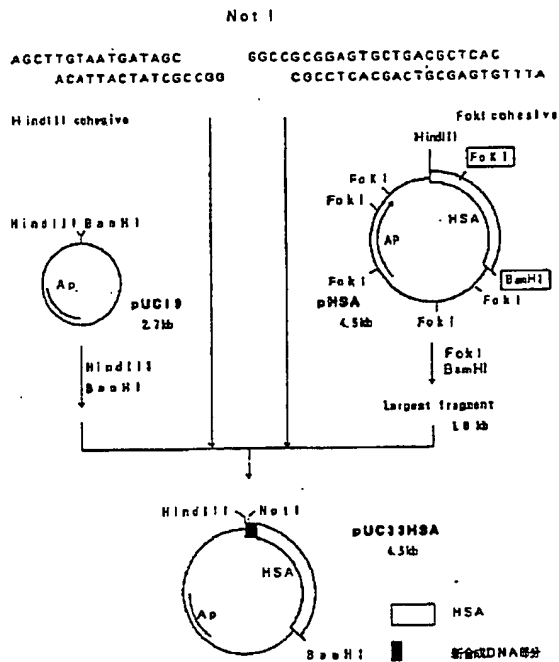
【図11】



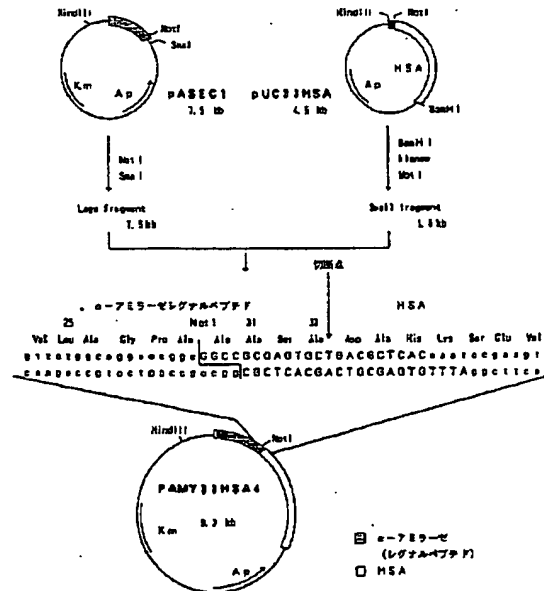
【図12】



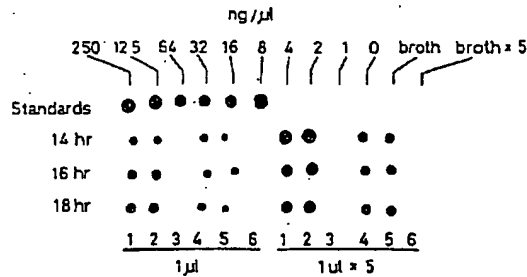
【図13】



【図14】



【図15】



【図18A】

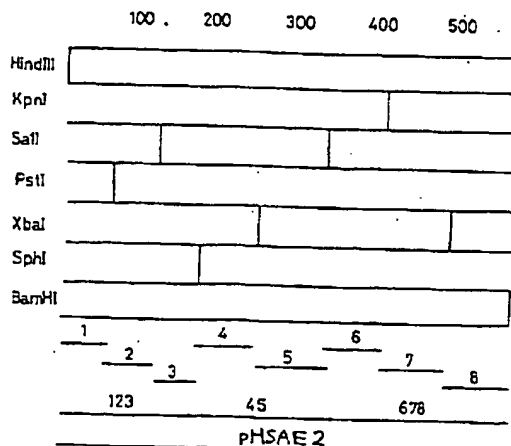
プロット1

Hind III  
 AGCTTGGGATGGACGCTCACAAATCGGAAGTTGGCCACCGTTTAAAGACCTGGCTGCGAA  
 ACCCTACCTGGAGTGTATTAGGCTTCAACGGCTGGCAAAATTTCTGGACCCACTGCTTTGAAGTT  
 AACTTCAAGCGCTGGTTCTGATCGCTTTGGCTCAGTACCTTCAGCAGTCCCGCTTGGAGGA  
 TCCCGACCAAGACTAGCGAAGCGAGTCAATGGAAGTCTCAGCGCAAGCTCCTGGTGAAT  
 CCACCTTAAACTGTAAACCAAGTAAACCGAATTGGCTAAACCTCGCTAGCTGACCAATCTGCA  
 TTGACCAATTTGCTTCAATGGCTTAAGCGATTTCGACCGATCGACTGCTTAG Pst I

【図16】

5' AAGCTTGGGA TGGACGCTCA CAAATCGGAA GTTGGCGACC GTTTTAAAGA CTTGGCTGAG  
 GAAAACTTCA AAGCGCTGCT TCTGATCGCT TTGCGTCACT ACCTTCAGCA GTGCGCGTTG  
 GAGGACCAAG TTAACCTGCT AAAACCAAGTA ACCGAATTCG CTAAACCTG CGTAGCTGAC  
 GAATCTGAGG AAAACTGCGA CAAATCCCTG CACACCTCTT TCGGTGACAA ACTGTGCACT  
 GTTGGGACCC TGGCGCAAAC CTACGCTGAA ATGGCTGACT CTTGGCTTAA ACACGCAACCC  
 GAACGCAAGC AATGCTTCTT TCAGCACAAA CACGACAACC CGAACCTGCC CCGCTGCTT  
 CGTGGCGAAG TCGACGTAAT GTGCACGACA TTCCACGACA ACGAACAAAC CTTCCTGAAA  
 AAATACCTCT ACGAAATGCC ACGCGCTGAC CCGTACTTCT ACGCACCGGA ACTGCTGTTT  
 TTGCTTAAAC GTTACAAAGC AGCTTTCAT TGAATGCTGC AGCGCGCTGA CAAAGCGGCA  
 TGCTTCTGCT CCAAACTGGA CGAAGTGGCT GACGAAGGTA AGGCTGCTTC TCGAAAAACG  
 CGCTGAAAT GCGCTTCTCT CCAGAAATTC GCTGAACGTC CATTCAAAGC GTGGGCACTT  
 GCGCGCTCTT CCGAGCGCTT CCGGAAAGCA CAATTGCGAG AAGTGTCTAA ACTGCTTACT  
 GACTGACCA AACTTCACAC CGAATGCTGC CACGCGGACC TTCTACACTG CCGACAGCAC  
 CGTGGCGACC TGGCGAAATA CATCTGCGAA AACGAGGACT CCATCTCTTC TAAACTGAAA  
 GAATGCTGCG AAAAACTGCT GCTGGAAAAA TCTCACTGCA TCGCAGAAAT AGAAAAAGAC  
 GAATGCTGCG CCGATCTGCT GTCTCTGCGG GCTDACTTGG TTGAATCAAA AGACGCTGTC  
 AAAAACTAGG CAGAAAGCAA AGACGTAAT CTAGGTATGT TCTGTACGA ATACCGCTCT  
 CCGACACCGG ACTACTCTGT GGTCTGCTG CTGCGCTTGG CAAAAACCTA CCAAACTACC  
 CTGGAATAAT GCTGCGGAGE GCTGACCCA CACGAATGCT ACGCAAAAGT GTTCCAGCAA  
 TTCAAAACCG TGGTTGAAGA ACCGCAAGAC CTGATCAAAC AGAATCGGCA ACTGTTGCAA  
 CAGCTGGGTG AATACAAAT CCAGAACGCT TCCGTGATTC GGTACACCAA AAGGTGACCG  
 CAGGTGCTA CTGCGACCTT GCTGGAAGTA TCCGTAACC TGGGTAAAGT TCGCTCTAAA  
 TGCTGCAAAC ACCCGGAAGC GAAACGTATG CCGTGGCGGG AAGACTACCT GTCCGTGCTG  
 CTGAACGAG TGTGCTTCT GCACGAAAAA ACCCGCTTTT CTGACCTGT AACTAAATGC  
 TGACCGAAT GTCTGTTAA CCGCGCTTCG TGCTTCTCGG CTCTAGAGGT TGACGAAACC  
 TACCTACCGA AAGAAATCAA CCGCAGAAAC TTCACTTTCC ACCCGACAT GTGACCCCTG  
 TCGGAAAAAG AACCGCAGAT CAAAAACAG ACCGCTCTGG TGGAACTGCT AAAACACAAA  
 CCGAAAGCAA CCAAGAGACA ACTGAAAGCG GTGATGAGC ACTTGGCAGC TTTCTAGAA  
 AAATGCTGCA AAGCTCAGCA CAAAGAAACC TGCTTGGCTG AACAAGCTAA AAAACTGGTA  
 CTTGCTCTC AGGCTGCACT GGGCTGTAA TGATAGGATC 3'

【図17】



【図18B】

プロット2

Pst I  
 GAAAACTGGACAAATCGTGCACACCGTCTTGGTACAACTGTGCACTGTGGACCGCTGGC  
 AGCTCTTTGACCGTCTTTAGGACCTGTTGGGACAGGCACTGTTTACACCTGACAAACCT  
 GAAACCTACCGTGAATGCTGACTGCTGGCTAAACAGCAACCGAAACCAAGCAATCTTCT  
 CCGACCGCTTGTGCTGCACTTACCGAGTGAAGAGCAATTTGTCTTGGCTTGGTTGCTT  
 TACGACAAAGACGACAAACCGCAAGCTGCGCGCTGCTTCTGCTGCAAG Sal I  
 ACGAAGCAAGTGTGTTTCTGCTTGGCTTGGACGGCGCGGACCAAGCGCTTCACT

【☒ 18 C】

7D 3

SalI  
TGCAGCTAATGTCCACCGCATCCACGACCAACGAAGAACCTTCTGAAAAATAC  
GCATTACACCTGCGCTAAGCTGTCTGTCTCTCTTGGAAAGCATTTTATGCGATGCT  
CTGTACGAATTCGACGCGCTACCGCTACTTCTACGCACCGGAATCTGTCTCTCG  
TTAGCGTGGCAGTGGCATGCAAGATCGCTGGCTTACGACCAAGACCAATTTGCA  
CTAAGCGTTACAAACAGCTTTCACTGAATGTCCGACGCGCGCTGACAAACCGCGCAT  
ATGTTTCTGCTCAAGTGTATGCAAGCTGCGCGCGCTGCTTTGCGC SphI

【図 18D】

プロク 4

Sph I  
CTCTGCTCCGCAAACTGGACCAACTCGCTGACGAAAGGTAAAGGCTCTTCTCCAAA  
GTACGACCAACGGCTTTGACCTGCTTGAACGACGCTGTTCTCTTCGACAGAACGCTTTTCTCCGAC  
CAGCGCTCCAAATCGGCTTTCTCCAGAACTTCGGTGAACCTGCATTCAAAG  
ACTTTAACGACGACGACGCTTTTAAGCCACTTCAGCTAAGTTTGGACCGCTC  
CTGGCGAGTTGGCGGCGCTCTCCAGCGCTTCCCGAAGACGAAATGCGCAGAT  
AAGCGCGGACGCGCTCGCGAAGCGCTTTCTCTTAAGCGCTTTCACAGATTG  
GTCTAAAGCTGTTACTGACCTGACCAAGGTTACACACGAAATGCTGCCACGGCGAAGTT  
ACCAATCTGACGACGCTTTCAAGTCTGGCTTACGACGGTGGCGCTGGAAGATC YbA.I

【図 18E】

70995

XbaI

CTAGASTCGGAGACGACCTCGGACCTGGCAATATCATCTGGAAACGAGGACTCCAT  
TCACGGCTCTCTGCGACGCTCGACCCCTTTATGTAGACGCTTTGTCCTGAGGTAGAGAAAT

CTCTTCTAAACTGAAGAAATGCTGGCAAAACCGCTGCTGCAAAATCTCACTGCATCGCAAA  
TTCACTTTCTTACGACCGTTTTGCGACGACCTTTTACAGTGACGTAGGCTTCTCATCTTT

GTAGAAACGCAAAATGCTGGGAGATCTGCGCTCTCTGCGGCGCTGACTTGGTTGAATCAAAAGAC  
GCTGCTTTACGGCCGCTAGACGGCAGACCGCGGCACTGAAGCAACTTATGTTTCTGCAACAGTT

GTGTGCAAAATCATCGGAGAACAAAGACAGTATTGCTAGGTATGTTCTGCTACCAATCGGCTGG  
TTTATGCTGCTTCTGCTTTCTGTGCTAGAGGATCATACAGGCACTCTTATATCGGACBCT

SalI

【図 18 F】

[illegible]

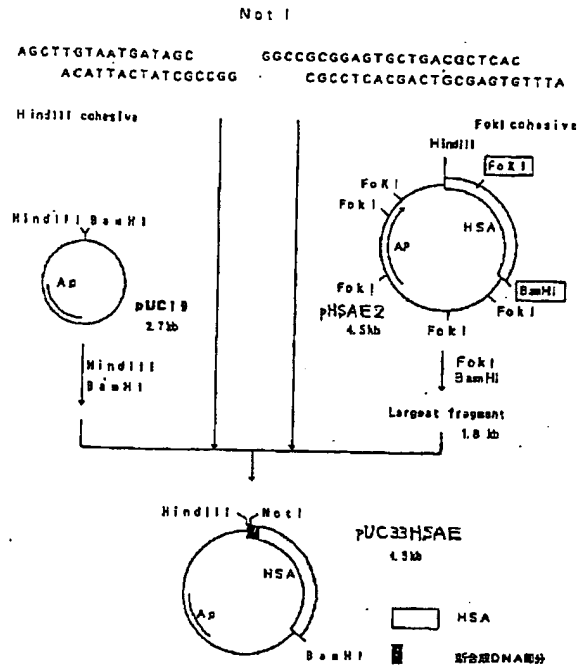
【図 18 G】

[illegible]

【☒ 18H】

[illegible]

【図 20】

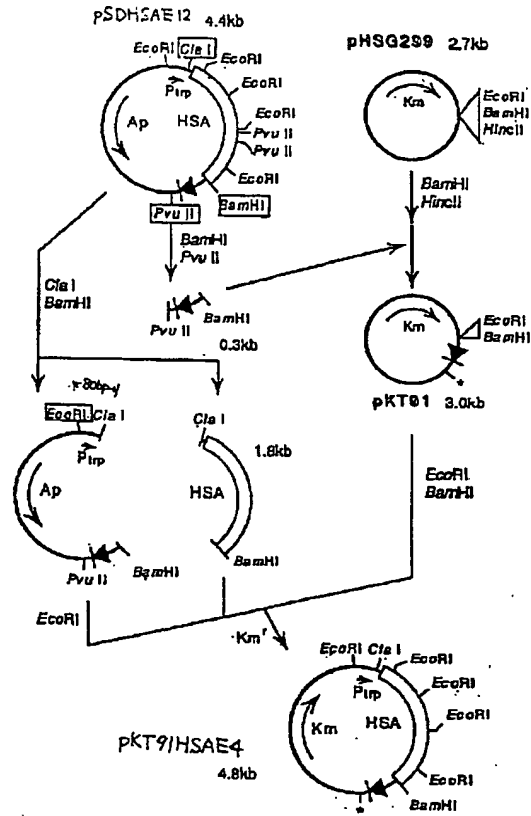


The diagram illustrates the cloning strategy for the HSA gene. It shows the digestion of pUC33HSAE with HindIII and NotI to create a 1.8 kb fragment, and pASEC1 with NotI and SmaI to create a 7.5 kb fragment. These are ligated into a pAMY33HSAE2 vector. A DNA sequence alignment shows the overlap between the HSA gene and the pAMY33HSAE2 vector, with a 100% identity region highlighted. The final construct, pAMY33HSAE2, contains the HSA gene flanked by HindIII and NotI sites.

**Legend:**

- α-アミラーゼ (α-glucosidase)
- HSA

【図22】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:125)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:125)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:08)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**